

Aus dem Lehrstuhl für Innere Medizin I
Direktorin: Prof. Dr. Martina Müller-Schilling
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Untersuchung der Mechanismen, über die das Chemokin *Monocyte chemoattractant protein -1* die Differenzierung von intestinalen Makrophagen verhindert

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg



vorgelegt von
Katharina Zeitler

2012

Aus dem Lehrstuhl für Innere Medizin I
Direktorin: Prof. Dr. Martina Müller-Schilling
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Untersuchung der Mechanismen, über die das Chemokin *Monocyte chemoattractant protein -1* die Differenzierung von intestinalen Makrophagen verhindert

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg



vorgelegt von
Katharina Zeitler

2012

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Bernd Salzberger
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Matthias Edinger
Tag der mündlichen Prüfung:	18. April 2012

Für meine Mutter

In Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Funktion und Aufbau des Darmes.....	1
1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	3
1.2.1 Morbus Crohn.....	4
1.2.2 Colitis ulcerosa	6
1.2.3 Ursachen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen	9
1.2.4 Die Rolle des Immunsystems bei chronisch entzündlichen Darm- erkrankungen.....	10
1.2.5 Intestinale Makrophagen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.....	11
1.3 Die Bedeutung dreidimensionaler und organotypischer Zellkulturmodelle in der medizinischen Forschung.....	13
1.3.1 Das multizelluläre Sphäroid.....	13
1.3.2 Organotypische Zellkulturen/ <i>tissue engineering</i>	14
1.4 Chemokine und ihre Beteiligung bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	15
1.4.1 Das <i>monocyte chemoattractant protein-1</i> und seine Rolle bei IBD.....	16
1.5 Arbeitsziele	18
 2. Material	 20
2.1 Herkunft von Material und Geräten	20
2.2 Fertigkombinationen von Biochemikalien.....	23
2.3 Antikörper.....	23
2.4 Nährmedien und Antibiotika	25
2.5 Puffer	26
 3. Methoden.....	 27
3.1 Zellkultur	27
3.1.1 HT-29	27
3.1.2 CCD-18 Co.....	27
3.1.3 QBI-293 A.....	28

3.2 Allgemeine Zellkulturtechniken	29
3.2.1 Einfrieren von Zellen.....	29
3.2.2 Auftauen von Zellen.....	29
3.2.3 Bestimmung der Zellzahl	30
3.3 Adenovirale Vektoren.....	31
3.3.1 Herstellung der adenoviralen Vektoren	31
3.3.2 Transfektion von Zelllinien.....	33
3.4 Dreidimensionale Zellkulturmodelle	34
3.4.1 Sphäroide	34
3.4.2 Kollagengele.....	36
3.5 Immunhistochemie	38
3.5.1 Gefrierschnitte	38
3.5.2 Immunfluoreszenz	38
3.6 Durchflusszytometrie.....	40
3.6.1 Färben der Zellen für durchflusszytometrische Untersuchungen	41
3.7 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	42
4. Ergebnisse	44
4.1 Transfektion von HT-29 Zellen.....	44
4.2 Phänotypische Charakterisierung intestinaler Makrophagen	47
4.3 Differenzierung von intestinalen Makrophagen	49
4.3.1 MCP-1 induziert die Migration von Monozyten in das multizelluläre Sphäroid	49
4.3.2 Der Einfluss von MCP-1 auf die Differenzierung von intestinalen Makrophagen.....	51
4.4 Untersuchung der Ursachen der Differenzierungsbehinderung durch MCP-1	57
4.4.1 Einfluss der Monozytenzahl auf die Differenzierung zu intestinalen Makrophagen im Sphäroidmodell	57
4.5 Differenzierung im „Organotypischen Kulturmodell“ (Kollagengelmodell)	67
5. Diskussion	68
5.1 Makrophagendifferenzierung im Sphäroidmodell	68
5.2 Organotypische Zellkulturmodelle	70
5.3 MCP-1 hemmt die Differenzierung intestinaler Makrophagen.....	71
5.4 Einfluss der Monozytenanzahl auf die Differenzierung intestinaler Makrophagen.....	73

5.5 Zusammenfassung.....	74
5.5.1 Untersuchung der in vitro Differenzierung intestinaler Makrophagen unter Einfluss von MCP-1	75
5.5.2 Untersuchung der Wirkungsmechanismen von MCP-1	75
Literaturverzeichnis.....	76
Lebenslauf.....	84
Danksagung	86
Eidesstattliche Erklärung.....	87

1. Einleitung

1.1 Funktion und Aufbau des Darmes

Der Gastrointestinaltrakt stellt ein komplexes System aus neural, endokrin und psychisch koordinierten Einzelorganen dar, die alle der Ernährung dienen. Der gesamte Verdauungstrakt reicht von oral bis anal und lässt sich in einen Kopf- und Rumpfdarm unterteilen. Der Kopfdarm besteht aus der Mundhöhle, den Zähnen sowie dem Rachen und den Speicheldrüsen. Hier erfolgt die Aufnahme, Zerkleinerung und Einspeichelung der Nahrung, die Geschmackswahrnehmung und der Schluckvorgang. Dem Rumpfdarm werden Speiseröhre, Magen, Dünndarm, Dickdarm und der Analkanal zugezählt.

Im Rumpfdarm findet die Weiterleitung und Speicherung der aufgenommenen Nahrung sowie die eigentliche Funktion des Gastrointestinaltraktes, die Verdauung, statt. Bei der Verdauung erfolgen der chemische Abbau der Nährstoffe und die Resorption über das Dünndarmepithel in den Blut- und Lymphgefäßen der Darmwand. Dazu tragen neben mechanischen Prozessen in Mund und Magen die Arbeit von Verdauungsenzymen des Magens und des Pankreas sowie die Galle bei. Weiterhin wird über die Mukosa des Gastrointestinaltraktes der Wasser- und Elektrolythaushalt geregelt. Der größte Teil der Wasserabsorption, bestehend aus Flüssigkeit durch die Nahrungsaufnahme, Speichel, Magensaft, Galle, Pankreassaft und Darmsaft, findet im Jejunum und Ileum statt.

Diese vielfältigen Einzelfunktionen des Darmes werden durch das vegetative Nervensystem und über die Freisetzung regulatorischer Peptide durch ein endokrines Zellsystem in Magen, Pankreas und Dickdarm gesteuert.

Des Weiteren spielt der Verdauungstrakt eine wichtige Rolle im Immunsystem. Das Darm-assoziierte Immunsystem (*gut-associated lymphoid tissue, GALT*) stellt sowohl quantitativ als auch funktionell einen wesentlichen Anteil am Immunsystem des Organismus dar. Es enthält 20-25 % der Darmschleimhaut und beinhaltet ca. 50 % aller lymphatischen Zellen. Das GALT besteht aus Lymphfollikeln der Mukosa und den Peyer-Plaques sowie Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen, die sich in

der Lamina propria und zwischen den Epithelzellen befinden. Die intestinale Mukosa schützt den Körper vor dem Eindringen pathogener Keime und Antigene aus dem Darmlumen und verhindert somit gleichzeitig eine überschießende Immunantwort. Neben weiteren Zellen, die an einer Immunreaktion beteiligt sind, wie Makrophagen, dendritische Zellen und T- Zellen, haben die intestinalen Epithelzellen somit eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung dieser Barriere (1).

Die verschiedenen Abschnitte des Rumpfdarmes besitzen einen ähnlichen Wandaufbau und unterscheiden sich darin nur geringfügig. Es wird hier beispielhaft der Wandaufbau des Kolons beschrieben.

An das Darmlumen schließt sich die Mukosa mit dicht gestellten, tiefen Krypten, die bis zur Muscularis mucosae ziehen, an. Das Oberflächen- und Kryptenepithel enthält zahlreiche Becherzellen und hochprismatische resorbierende Zellen, die lange Mikrovilli tragen. Es folgt die Lamina propria, die aus retikulärem Bindegewebe bestehende mittlere Schicht der Mukosa. Sie enthält neben Blutgefäßen zahlreiche freie Zellen wie Makrophagen, Fibroblasten, T-Zellen, dendritische Zellen, Lymphozyten und stellenweise Lymphfollikel. Die sich anschließende Muscularis mucosae besteht aus mehreren Lagen glatter Muskelzellen. Die Tela submucosa ist aufgebaut aus lockerem Bindegewebe und Fettzellen und ist reich an Lymphozyten und Lymphfollikeln sowie kleineren und mittleren Blutgefäßen und enthält den Plexus submucosus. Die Tunica muscularis besteht aus einer inneren Ringmuskulatur (Stratum circulare) und einer äußeren Längsmuskulatur (Stratum longitudinale), die drei kräftige Bündel (Taenien) bildet. Zwischen diesen beiden Muskelschichten liegt der Plexus myentericus. Typische Strukturen des Kolons sind quer gestellte Schleimhautfalten (Plicae semilunares), die durch die Ringmuskelschicht gebildet werden. Die Ausbuchtungen zwischen zwei Falten werden als Haustrien bezeichnet (2).

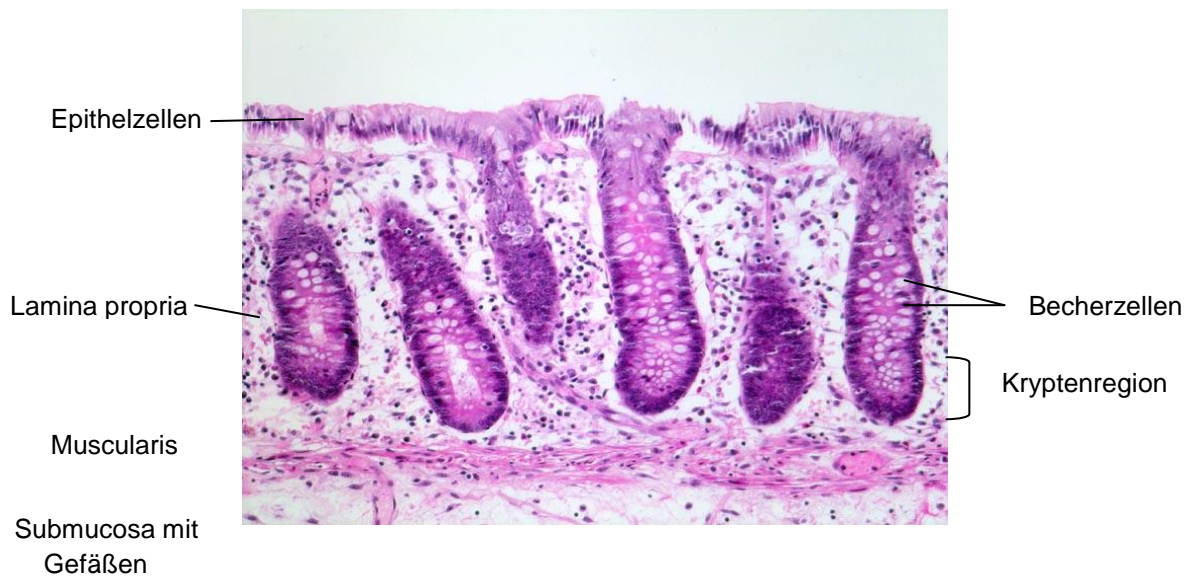


Abb. 1.1: Aufbau der Darmwand, Präparat aus dem Kolon. An das Darmlumen schließt sich die Mukosa an, die aus Epithelzellen und Becherzellen, der Lamina propria mit Makrophagen, Fibroblasten und T-Zellen und der Muscularis mucosa besteht.

1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Unter dem Begriff chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) versteht man rezidivierende entzündliche Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes. Die beiden bekanntesten Vertreter der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen sind der Morbus Crohn und die Colitis ulcerosa. Die erste Beschreibung dieses Krankheitsbildes erfolgte durch Giovanni Battista Morgagni (1682-1771), der von einem 20-jährigen Patienten mit blutigen Durchfällen und kolikartigen Bauchschmerzen berichtete. Der Begriff der „Ileitis terminalis“ wurde 1932 von Crohn, Ginzburg und Oppenheimer geprägt, die ein Patientenkollektiv mit granulomatöser Entzündung des distalen Ileums beschrieben (3).

Trotz zahlreicher Erkenntnisse über mögliche Krankheitsursachen, Krankheitsverlauf, Komplikationen und einer Vielzahl an verschiedenen therapeutischen Optionen, bleibt die Ätiologie und Pathogenese der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen weitgehend ungeklärt.

Beide Erkrankungsformen, der Morbus Crohn und die Colitis ulcerosa, treten mit einer Häufigkeit von 100-200/100.000 Einwohnern auf. Die in den letzten Jahrzehnten kontinuierlich ansteigende Prävalenz lässt sich auch auf eine

Verbesserung der diagnostischen Möglichkeiten zurückführen. Die Erstmanifestation beider chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen tritt meist im jungen Alter zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr auf. Bei beiden Erkrankungen ist eine geographische und ethnische Häufung mit Begünstigung von Nordeuropäern und Nordamerikanern erkennbar (4).

1.2.1 Morbus Crohn

Beim Morbus Crohn kann der gesamte Gastrointestinaltrakt von oral bis anal von entzündlichen Veränderungen betroffen sein. Charakteristisch für den Morbus Crohn ist transmurales und diskontinuierliches Befallsmuster. Die Entzündung betrifft alle Darmwandschichten von der Mukosa bis zur Muscularis propria und Serosa, wobei ein Nebeneinander von gesunden und erkrankten Darmabschnitten vorliegt („Skip-Lesions“). Die häufigste Lokalisation ist das terminale Ileum, grundsätzlich kann jedoch der gesamte Magen-Darm-Trakt betroffen sein (Abb. 1.2).

Morbus Crohn - Befallsmuster

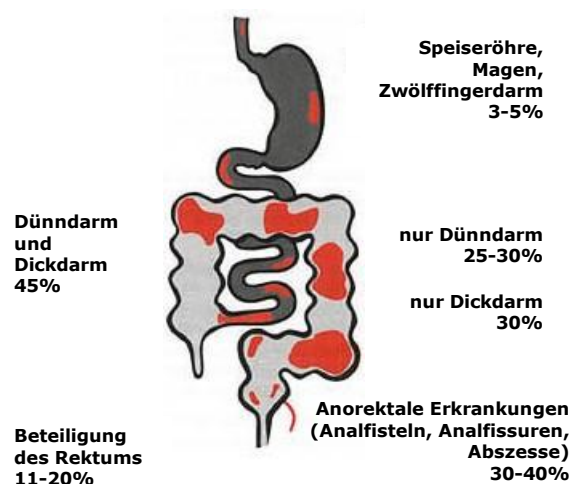


Abb. 1.2: Befallsmuster des Morbus Crohn

Leitsymptome des Morbus Crohn sind krampfartige, oft rechtsseitig lokalisierte Bauchschmerzen und schleimige Diarrhöen sowie Fieber und Gewichtsverlust. Extraintestinale Symptome wie eine Gelenkbeteiligung (in Form von Oligoarthritis), der Befall der Haut (Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum) oder anderer Organsysteme (Uveitis und Iritis) sind häufig nachzuweisen.

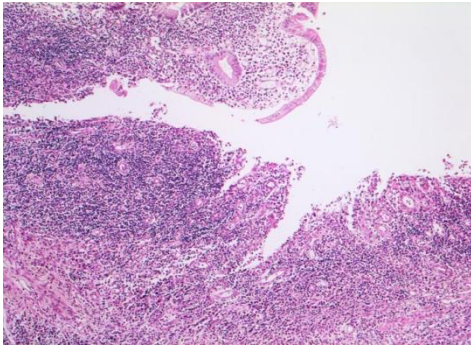
Der Krankheitsverlauf ist chronisch schubweise und nimmt Einfluss auf alle vitalen, psychischen und sozialen Funktionen. Als Komplikationen des Morbus Crohn können Fisteln, Abszesse und Stenosen von Darmabschnitten auftreten, die häufig eine chirurgische Therapie erfordern (4).

Der Morbus Crohn bietet eine makromorphologische Vielfalt in Form von aphtösen Schleimhautläsionen und gartenschlauchartiger Stenosen und Strikturen. Charakteristisch für den Morbus Crohn sind strich- und spaltförmige, fissurale Läsionen der Schleimhaut, die das Bild eines Kopfsteinpflasterreliefs schaffen.

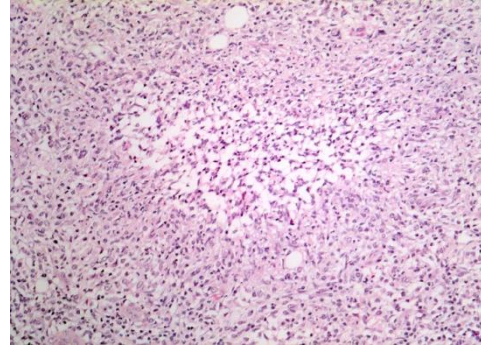


Abb. 1.3: Florider Morbus Crohn mit umschriebener Darmwandstenose und hämorrhagischer Entzündung und Pflastersteinrelief der Schleimhaut

Histologisch zeigt sich ein diskontinuierlich und disproportional entwickeltes, transmurales, lymphoplasmazelluläres und granulozytäres Entzündungszellinfiltrat. Des Weiteren findet man Lymphfollikel mit aktivierten Keimzentren sowie in etwa der Hälfte der Fälle sogenannte histiozytäre Mikrogranulome (5).



a) Morbus Crohn, HE-Färbung: Ulkus mit Granulationsgewebsbildung und Verplumpung der entzündlich infiltrierten Dünndarmzotten



b) Morbus Crohn, HE-Färbung: Granulom aus Epitheloidzellen und Granulozyten

Abb. 1.4: Histologische Schnitte pathologischer Darmwandveränderungen beim Morbus Crohn

1.2.2 Colitis ulcerosa

Bei der Colitis ulcerosa ist die Entzündung auf die Darmmukosa beschränkt. Die Entzündung manifestiert sich dabei zu Beginn fast immer im Rektum und breitet sich dann kontinuierlich nach proximal aus und betrifft in 10-20% das gesamte Kolon. Die Kolitis kann auch allein das Rektum betreffen (Proctitis ulcerosa) und in seltenen Fällen zeigt sich auch das terminale Ileum leicht entzündet, was als sogenannte *Backwash Ileitis* bezeichnet wird.

Colitis ulcerosa - Befallsmuster

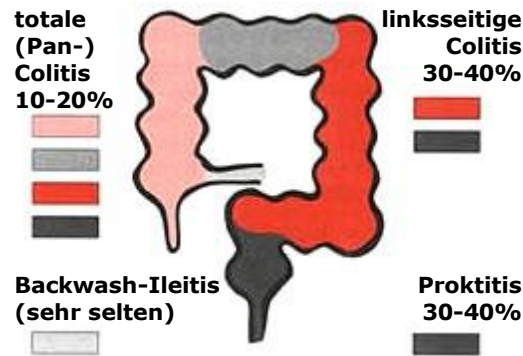


Abb. 1.5: Befallsmuster der Colitis ulcerosa

Leitsymptome der Colitis ulcerosa sind, neben meist linksseitigen Unterbauchschmerzen, blutig-schleimige Diarrhöen sowie ein ständiger Stuhldrang und schmerzhaftes Stuhlentleerungen (Tenesmen). Ebenso treten, wie beim Morbus Crohn, extraintestinale Manifestationen der Erkrankung auf. Des Weiteren wird eine Assoziation der Colitis ulcerosa mit der primär sklerosierenden Cholangitis beobachtet. Als eine weitere Komplikation wird das toxische Megakolon als Folge einer schweren transmuralen Entzündung mit der Gefahr der Darmperforation gefürchtet. Bei langjährigem Krankheitsverlauf steigt die Inzidenz eines kolitisassoziierten Adenokarzinoms, was eine regelmäßige Koloskopie als präventive Maßnahme erforderlich macht (4).

Makroskopisch zeigen sich bei chronischem Krankheitsverlauf ein Verlust des Faltenreliefs der Schleimhaut sowie Schleimhauterosionen und Ulzerationen. Diese werfen stellenweise die Schleimhaut auf und führen so zu entzündlichen pseudopolypösen Schleimhautauffaltungen.

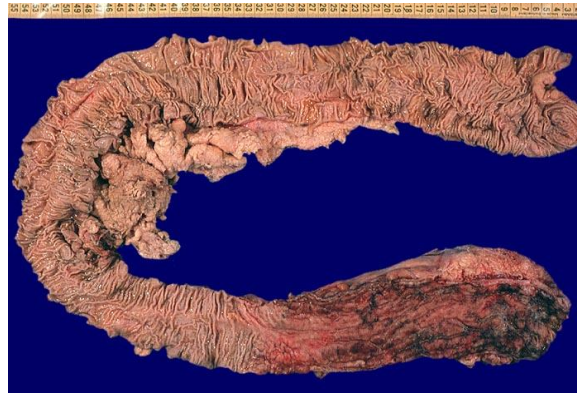
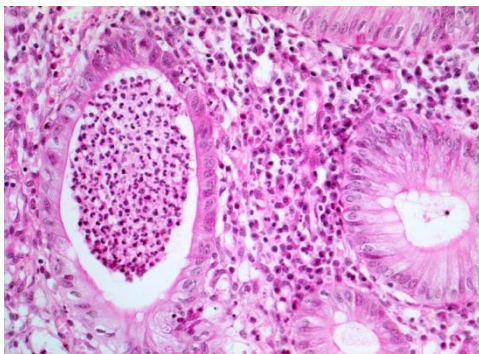
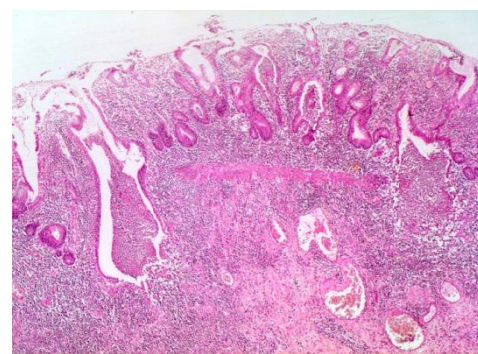


Abb. 1.6: Proctitis ulcerosa: totale Kolektomie mit deutlich distal betonter, auf das Rektum beschränkte entzündliche Veränderungen mit typischen längsgerichteten Ulzera und Schleimhautrötung

Mikroskopisch erkennt man ein entzündliches Infiltrat, bestehend aus Lymphozyten, Plasmazellen sowie neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, das sich vorwiegend in der Mukosa und Submukosa befindet (mukosale Kolitis). In den Schleimhautkrypten finden sich typischerweise Granulozyteninfiltrate, die sich als Kryptenabszesse darstellen (5).



a) Colitis ulcerosa, HE-Färbung: verdichtetes Entzündungsinfiltrat in der Lamina propria; dilatierte Krypte, gefüllt mit Granulozyten (Kryptenabszess)



b) Colitis ulcerosa, HE-Färbung: schwer gestörte Kryptenarchitektur mit verzweigten und unregelmäßigen Krypten, deutlich erhöhter Entzündungszellgehalt der Lamina propria

Abb. 1.7: Histologische Veränderungen bei der floriden Colitis ulcerosa

1.2.3 Ursachen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Der entscheidende Faktor in der Ätiopathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist bisher nicht bekannt. Es wird vermutet, dass die Erkrankungen bei bestehender genetischer Prädisposition durch exogene Faktoren verstärkt werden.

Durch Fortschritte im Bereich der medizinischen Forschung wurde in den letzten Jahren vermehrt nach Veränderungen auf molekulargenetischer Ebene gesucht. Hier wurde eine der bedeutendsten Mutationen auf dem Chromosom 16 im Bereich des Zentromers entdeckt. Träger dieser Genmutation sind anfälliger, an Morbus Crohn zu erkranken, nicht aber an Colitis ulcerosa (6). Das als NOD2/CARD 15 bezeichnete Genprodukt gilt als das erste Suszeptibilitätsgen für Morbus Crohn. Das CARD 15 (caspase-activating recruitment domain 15) Gen ist ein intrazellulärer Rezeptor für bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) und ist in Monozyten exprimiert. Das CARD 15 Protein bindet bakterielle Lipopolysaccharide und aktiviert nachfolgend den postinflammatorischen Transskriptionsfaktor *nuclear factor kappa B* (NF- κ B). Eine Mutation durch Insertion eines Cytosins (3020insC) zeigt eine reduzierte Aktivierbarkeit nach Stimulation mit Lipopolysacchariden (7). Weitere Mutationen des CARD 15 Gens, wie beispielsweise die 1007fs Mutationsvariante, treten bei Patienten mit kompliziertem Krankheitsverlauf des Morbus Crohn mit Stenosen- und Fistelbildung auf (8). Neben der genetischen Prädisposition scheinen auch verschiedene Umwelteinflüsse bei der Entstehung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen einen Einfluss zu haben. Eine Inzidenzzunahme des Morbus Crohn bei Kindern und Jugendlichen in westlichen Industrienationen in den letzten Jahrzehnten brachte die Hypothese der Hygienebedingungen in die Diskussion. Demnach würde ein übertriebenes hygienisches Verhalten in früher Kindheit die Zunahme chronisch entzündlicher Darmerkrankungen begünstigen. Des Weiteren soll eine Infektion mit *Helicobacter pylori*, Helminthen und Masern eine Rolle spielen (9). Orale Kontrazeptiva, Diät, sozialer Standard, Stress und Rauchen scheinen weitere Einflussfaktoren zu sein (10). Während das Rauchen den Krankheitsverlauf des Morbus Crohn negativ beeinflusst, gilt es als erwiesen, dass Nikotin bei der Colitis ulcerosa protektiv wirkt (11).

Zudem ergab sich aus Tiermodellversuchen und klinischen Studien die Hypothese, dass die bakterielle Darmflora eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese und

Aufrechterhaltung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen spielt. Hier liegt eine abnormale Immunreaktion des Körpers auf die eigene Darmflora und somit eine fehlende Toleranz gegenüber der normalen Darmflora vor. Es scheint bis jetzt nicht geklärt, ob bakterielle Antigene der körpereigenen Darmflora oder andere pathogene Keime die Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen induzieren (12, 13).

Des Weiteren scheint ein gestörtes Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen vorzuliegen (14). Darüberhinaus liegt eine Fehlregulation intestinaler T- Lymphozyten und Makrophagen vor (15, 16,17).

Mittlerweile existieren zahlreiche Ansätze, um die Ätiologie und Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu klären und geeignete Therapieschemen zu entwickeln. Die Therapie des Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa setzt ihren Schwerpunkt auf die symptomatische Therapie und auf den Einsatz von Immunsuppressiva. Basierend auf neuen Erkenntnissen zur Immunpathogenese der CED werden innovative Therapiekonzepte getestet, wie z. B. die Beeinflussung der Interaktion zwischen Darmepithelzellen und bakteriellen Antigenen oder die Immunstimulation. Trotz dieser Fortschritte im Verständnis der Pathophysiologie und der Bedeutung des mukosalen Immunsystems bleiben jedoch zahlreiche Fragen über die molekulare Immunpathogenese der CED offen und bedürfen weiterer Untersuchungen (18).

1.2.4 Die Rolle des Immunsystems bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Das intestinale Immunsystem besteht aus einer Vielzahl an Zellen, die miteinander über verschiedene Botenstoffe (Zytokine) kommunizieren und interagieren. Sowohl pro-inflammatorische Zytokine wie z.B. Interleukin-1 (IL-1) (19), Interleukin-8 (IL-8) (20), Interleukin-12 (IL -12) (21) und Tumor Nekrose Faktor (TNF) (22), als auch anti-inflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 Rezeptor Antagonist (IL-1 Ra) (23) und Interleukin-10 (IL-10) (24) sind für das Gleichgewicht des intestinalen Immunsystems verantwortlich. Bei Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung ist dieses

Gleichgewicht gestört und es herrscht ein Übergewicht an pro-inflammatorischen Faktoren (14, 25). IL-1 und TNF werden bei erkrankten Patienten verstärkt von aktivierten Monozyten und Makrophagen sezerniert. Dies veranlasst intestinale Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Fibroblasten und glatte Muskelzellen vermehrt Prostaglandine, Proteasen und andere Entzündungs- und Chemotaxismediatoren zu sezernieren (26). Im akuten Schub der Entzündung liegt außerdem eine gesteigerte Freisetzung von Stickoxiden und Sauerstoffradikalen vor, die zu einer lokalen Gewebsschädigung führen können.

Die Bedeutung von intestinalen Makrophagen und glatten Muskelzellen in der Pathogenese und Aufrechterhaltung der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist bisher nur wenig untersucht worden. Ihre Fähigkeit, Akutphase-Zytokine wie IL-6 und Chemokine wie IL-8 sezernieren zu können, weist auf eine mögliche Bedeutung für das intestinale Immunsystem hin.

1.2.5 Intestinale Makrophagen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Intestinale Makrophagen spielen eine besondere Rolle innerhalb der Immunpathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Eine große Anzahl an intestinalen Makrophagen findet sich in der Lamina propria unmittelbar subepithelial, wo sie die größte antigenpräsentierende Zellpopulation darstellt. Somit bilden sie eine erste Barriere des Immunsystems an der größten Oberfläche und gleichzeitig größten Kontaktstelle zur höchsten Antigendichte des Körpers. Die intestinalen Makrophagen repräsentieren eine der größten Makrophagenpopulationen des menschlichen Körpers (27).

Generell sind Makrophagen fähig, eine Vielzahl an pro-inflammatorischen Zytokinen, freien Sauerstoffradikalen und Proteasen zu sezernieren sowie Pathogene zu phagozytieren und lysosomal zu degradieren. Des Weiteren sind Makrophagen in der Lage, eine klonale T-Zell-Expansion zu induzieren. Intestinale Makrophagen der gesunden, nicht entzündeten Mukosa haben jedoch eine Vielzahl dieser Fähigkeiten durch eine spezifische Differenzierung verloren und haben sich zu einem anergen Zelltyp entwickelt. Eine Stimulation mit LPS induziert im Gegensatz zu

Blutmonozyten keine Sekretion von IL-1 und TNF, da LPS-Rezeptoren (TLR-4 und CD14) auf intestinalen Makrophagen nicht exprimiert sind (28-31). Darüber hinaus können normale intestinale Makrophagen keine klonale T-Zell-Expansion induzieren, da ihnen die dafür notwendige Expression der ko-stimulatorischen Moleküle CD 80 (B7-1) und CD 86 (B7-2) fehlt (32, 33).

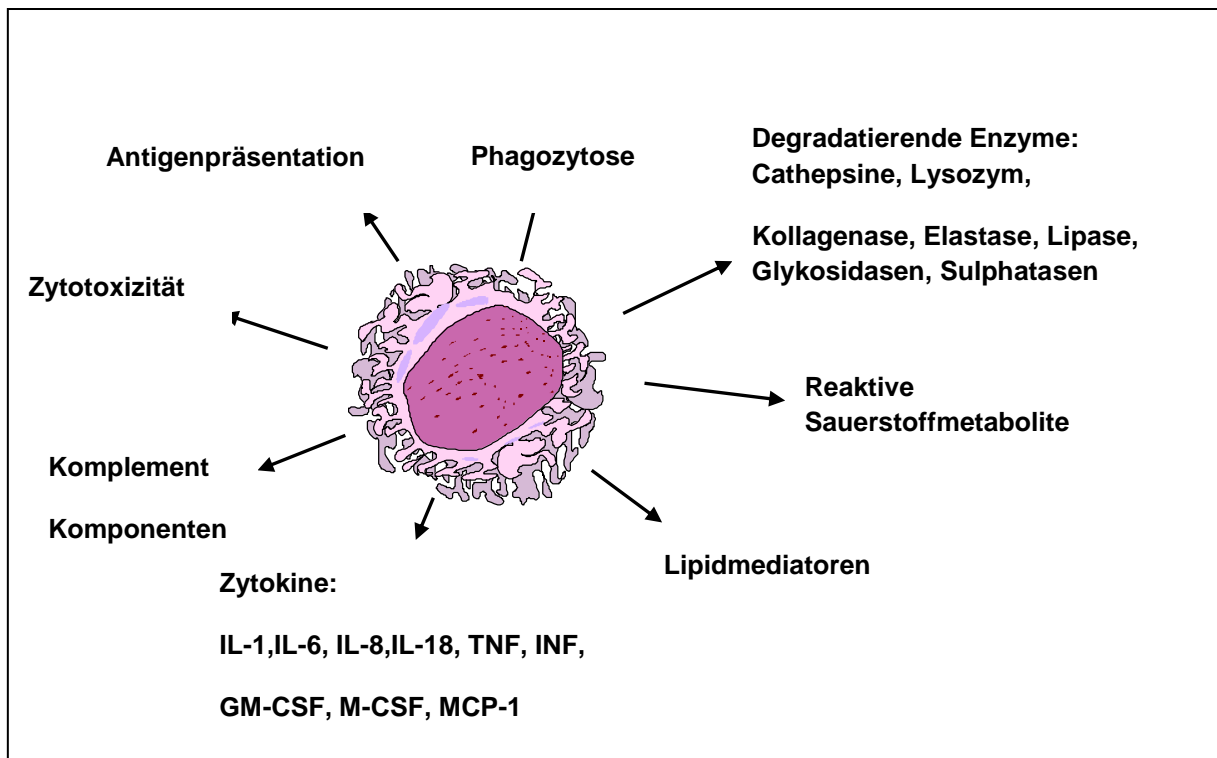


Abb. 1.8: Die Funktionen und Mediatoren von Makrophagen: Aufgeführt sind charakteristische Funktionen von Makrophagen (links), Mediatoren die von Makrophagen sezerniert werden (unten) und Mediatoren die extra- oder intrazellulär degradativ wirken (rechts).

Die Population von intestinalen Makrophagen in der Mukosa von Patienten mit aktiven chronisch entzündlichen Darmerkrankungen unterscheidet sich sowohl von ihrem Phänotyp als auch von ihrem Aktivierungszustand von der Makrophagenpopulation aus gesunder, nicht entzündeter Mukosa. In entzündeter Mukosa findet sich eine vergrößerte Population an intestinalen Makrophagen, die eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Entzündungsreaktionen spielen. Sie sezernieren große Mengen an pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-1, IL-6, IL-8, IL-18 und TNF), Sauerstoffradikale und Proteasen (27).

Zur Charakterisierung und Isolation von intestinalen Makrophagen wurde CD 33 als verlässlicher positiver Oberflächenmarker etabliert (31). Es konnte gezeigt werden,

dass intestinale Makrophagen entzündeter Mukosa im Gegensatz zu Makrophagen gesunder Darmmukosa einen Phänotyp mit vermehrter Expression aktivierender Oberflächenrezeptoren wie CD 14, CD16, CD11b und HLA-DR entwickeln (34). Des Weiteren konnte erwiesen werden, dass während der intestinalen Entzündung eine Aktivierung des *Nuklear factor kappa B* (NF- κ B) in intestinalen Makrophagen vorliegt (35). NF- κ B ist fähig, proentzündliche Gene zu induzieren.

1.3 Die Bedeutung dreidimensionaler und organotypischer Zellkulturmodelle in der medizinischen Forschung

In den vergangenen drei Jahrzehnten wurden verschiedene dreidimensionale Zellkulturmodelle entwickelt, um *in vitro* Mechanismen wie z. B. Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung zu erforschen (36). Die im Labor normalerweise verwendete Monolayer-Zellkultur stellt eine für die meisten Gewebe atypische Wachstumsform dar und erscheint daher für die medizinische Forschung nur bedingt anwendbar. Im dreidimensionalen Modell sind die Zellen häufig in der Lage ihre biochemischen Funktionen und morphologischen Merkmale aufrechtzuerhalten (37).

1.3.1 Das multizelluläre Sphäroid

Das in den Vorarbeiten zu dieser Arbeit verwendete multizelluläre Sphäroid stellt eine besondere Form der dreidimensionalen Zellkultur dar. Man bezeichnet dieses Modell auch als Mikroorgane oder organotypische Kulturen, da Sphäroide höher differenzierte Strukturen entwickeln als die im Monolayer gezüchteten Zellen.

Seit ihrer Einführung in den frühen 70er Jahren (38, 39) haben vor allem Sphäroide aus Tumorzellen eine große Bedeutung für die Tumorforschung gewonnen. Die ausgeprägte Gewebeähnlichkeit des multizellulären Sphäroidmodells erlaubt eine tumornahe Analyse der therapeutischen Wertigkeit eines Wirkstoffes. Die Wirkung

verschiedener therapeutischer Ansätze wie z. B. Strahlen- und Chemotherapie wurden an diesem Modell untersucht (40). Auch die Differenzierung und Reifung von Makrophagen wurde im dreidimensionalen Sphäroid untersucht (41).

Zudem wurde das Sphäroidmodell als ein *in vitro* Differenzierungsmodell für intestinale Makrophagen etabliert. Hier konnte gezeigt werden, dass multizelluläre Sphäroide aus intestinalen Epithelzellen in der Lage sind, in einem Zeitraum von sieben Tagen bei eingewanderten elutrierten Blutmonozyten einen Phänotyp ähnlich dem der intestinalen Makrophagen zu erzeugen (42).

1.3.2 Organotypische Zellkulturen/ *tissue engineering*

In den letzten Jahren hat sich die Forschung im Bereich der Herstellung von organotypischen Kulturen stark weiterentwickelt. Verschiedene Materialien, wie z. B. Metalle (Titan), Keramik, synthetische Polymere (Polyurethane, Silikone) und natürliche Polymere (Kollagene) werden als Gerüstsubstanzen für künstliche Gewebe und Organe verwendet (43).

Kollagen gilt als eines der meist verwerteten Materialien für dreidimensionale Zellkulturmodelle in unterschiedlichen Forschungsgebieten (44, 45). Fibroblasten, die in eine Kollagenmatrix eingebettet werden, sind in der Lage, diese Matrix zu kontrahieren. Dieses Phänomen wird häufig als Modell für Wundheilungsprozesse verwendet (46).

Das organotypische Zellkulturmodell wurde auch zur Erforschung von Zellinteraktionen in der intestinalen Mukosa eingesetzt. Hier konnte gezeigt werden, dass im dreidimensionalen organotypischen Zellkulturmodell Monozyten zu intestinalen Makrophagen differenzieren, wenn sie mit intestinalen Fibroblasten und intestinalen Epithelzellen kokultiviert werden. Die typischen Monozyten/Makrophagen Oberflächenrezeptoren wie z. B. CD 14, CD 16, CD 11b, CD 11c und die ko-stimulierenden Moleküle CD 80 und CD 86 wurden nach Kultivierung im organotypischen Zellkulturmodell nicht mehr auf den Makrophagen exprimiert. Intestinale Epithelzellen scheinen hier bei der Differenzierung von intestinalen Epithelzellen eine wichtige Rolle zu spielen (47, 48, 49, 50).

1.4 Chemokine und ihre Beteiligung bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Chemokine sind chemotaktisch wirkende Zytokine, deren Hauptfunktion in der Auslösung der Chemotaxis bei Immunzellen besteht. Des Weiteren wirken Chemokine regulatorisch auf die Reifung und das Migrationsverhalten von Leukozyten sowie auf die Ausbildung lymphatischen Gewebes ein (51, 52). Chemokine binden an G-Protein gekoppelte Rezeptoren und vermitteln so über intrazelluläre Signalwege die Zellaktivierung (53).

Mittlerweile konnte eine Beteiligung einiger Chemokine an der Organogenese, der Angiogenese und bei der Entstehung von Neoplasien nachgewiesen werden (54, 55, 56).

Chemokine sind kleine Proteine, die aus ca. 75-125 Aminosäuren bestehen und eine Molmasse von 8-15 kDa aufweisen. Die Aminosäuresequenz innerhalb der Chemokinfamilie ist unterschiedlich konserviert, während Chemokine eine streng konservierte Tertiärstruktur besitzen. Der Kernbereich ist aufgebaut aus drei antiparallelen β -Faltblättern und ist begrenzt von einer C-terminalen α -Helix und einem kurzen N-terminalen Segment. Ein weiteres Merkmal der Chemokine ist eine Gruppe von Cysteinresten, die eine oder zwei Disulfidbrücken ausbilden können. Aus der Anzahl und Position der Cysteinreste am Amino-Terminus leitet sich die systematische Nomenklatur der Chemokine ab. Es lassen sich so vier Unterfamilien unterscheiden. Bei den CC-Chemokinen folgen die beiden ersten Cysteine direkt aufeinander, während sie bei den CXC-Chemokinen durch eine Aminosäure getrennt sind. Bei den CX3C-Chemokinen werden die Cysteinreste durch drei weitere Residuen getrennt. Im Gegensatz dazu liegt bei den C- Chemokinen nur ein einzelner Cysteinrest vor (53).

Es konnte beobachtet werden, dass Chemokine eine wichtige Rolle in der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen spielen. So zeigt sich beispielsweise eine Einwanderung von Leukozyten in das Entzündungsgebiet durch eine erhöhte Produktion bestimmter Chemokine (57, 58).

1.4.1 Das *monocyte chemoattractant protein-1* und seine Rolle bei IBD

Das *Monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) gehört der CC-Chemokin-Familie an und ist auch unter der Bezeichnung CCL2 (chemokine C-C motif ligand 2) bekannt. MCP-1 besteht aus 76 Aminosäuren und besitzt eine Molekularmasse von 15 kDa. Das Chemokin wird von Mastzellen, polymorphkernigen Neutrophilen, Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten produziert und über NF- κ B reguliert (59, 60).

Die Aufgabe des *Monocyte chemoattractant protein-1* besteht darin, Leukozyten anzulocken. Somit spielt MCP-1 eine bedeutende Rolle als Mediator bei der Regulation einer gerichteten Leukozytenwanderung im Rahmen von Entzündungsprozessen. MCP-1 bewirkt über Chemotaxis eine Migration von Monozyten und Basophilen, nicht aber von Neutrophilen und Eosinophilen. MCP-1 ist bei der Pathogenese von Erkrankungen beteiligt, die mit Monozyteninfiltration verbunden sind, wie Psoriasis, rheumatoider Arthritis oder der Arteriosklerose (61). Es konnte gezeigt werden, dass MCP-1 eine bedeutende Rolle bei der Entstehung des Myokardinfarktes spielt und durch pro- inflammatorische Zytokine und Hypoxie reguliert wird (62, 63). Darüber hinaus hat das *Monocyte chemoattractant protein-1* durch Modulation von Zell-Proliferation und Migration und durch Synthese von Extrazellulärmatrix einen Einfluss auf die Entstehung einer Fibrose. So wird beispielsweise die Beteiligung von MCP-1 bei der Myokardinfarktheilung und dem Post-Myokardinfarkt-Remodelling diskutiert (64).

In der Mukosa von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zeigte sich eine erhöhte Sekretion von MCP-1 durch Epithelzellen. Dies bewirkt den Aufbau eines chemotaktischen Gradienten, der eine erhöhte Migration von Monozyten/Makrophagen aus dem Blutstrom durch das Endothel in die Mukosa und Submukosa zur Folge hat (65, 66, 67). Es konnte im dreidimensionalen Zellkulturmodell gezeigt werden, dass eine MCP-1 -Überexpression eine verstärkte Migration von Monozyten in das multizelluläre Sphäroid bewirkt. Des Weiteren beeinflusst das *Monocyte chemoattractant protein-1* die Differenzierung von Monozyten zu intestinalen Makrophagen. In MCP-1 transfizierten multizellulären Sphäroiden wird dieser Differenzierungsweg im Gegensatz zu nicht-transfizierten dreidimensionalen Aggregaten unterdrückt. Im Vergleich zu den nicht-transfizierten

Kontrollaggregaten zeigte sich in MCP-1 transfizierten multizellulären Sphäroiden eine erhöhte CD 14 Expression auf Monozyten/ intestinalen Makrophagen (68).

1.5 Arbeitsziele

Intestinale Makrophagen (IMAC) spielen eine besondere Rolle innerhalb des Immunsystems und repräsentieren eine der größten Makrophagenpopulation des menschlichen Körpers. Sie stellen durch ihre Lokalisation in der Lamina propria des Darmes eine erste Barriere des Immunsystems an der größten Oberfläche und gleichzeitig größten Kontaktstelle zur höchsten Antigendichte des Körpers dar (27).

Intestinale Makrophagen in nicht-entzündeter Mukosa weisen eine spezifische Differenzierung zum anergen Phänotyp auf, der eine fehlende Expression von CD 14 (LPS-Rezeptor), CD 16 (FcγIII-Rezeptor) oder CD 11 (Integrin) zeigt (28). Dieser Differenzierungsweg scheint bei Patienten mit chronisch-entzündlicher Darmerkrankung gestört.

In Vorarbeiten gelang die Charakterisierung und Isolation intestinaler Makrophagen (31). Zudem konnte mit dem multizellulären Sphäroidmodell ein *in vitro* Differenzierungsmodell etabliert werden, mit Hilfe dessen der Differenzierungsweg zum Phänotyp der intestinalen Makrophagen untersucht werden konnte (42).

Des Weiteren konnte bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen eine vermehrte, entzündungsassoziierte Expression des Chemokins „monocyte chemoattractant protein 1“ (MCP-1) nachgewiesen werden, das die spezifische Differenzierung von intestinalen Makrophagen verhindert (68).

- 1. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die in Vorarbeiten beobachtete spezifische Differenzierung von Monozyten zu intestinalen Makrophagen im dreidimensionalen Sphäroid zu bestätigen und zu vertiefen. Insbesondere sollte eine Bestätigung des Effektes von MCP-1 auf den Differenzierungsweg erfolgen. Zum Nachweis wurden hier sowohl durchflusszytometrische, als auch immunhistochemische Analysen herangezogen.**

2. Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Untersuchung der beobachteten Differenzierungsbehinderung durch MCP-1. Bereits in Vorarbeiten wurden Möglichkeiten dieser Differenzierungshemmung diskutiert. Es wurde vermutet, dass hier die Monozytenzahl einen Einfluss auf die Differenzierung von Blutmonocyten zu intestinalen Makrophagen hat (68). Um einen möglichen Einfluss der Monozytenzahl auf den Differenzierungsweg zu intestinalen Makrophagen zu überprüfen, wurde eine Titrierung der zugegebenen Monozyten in das multizelluläre Sphäroidmodell mit einer Reduktion der Monozytenzahl vorgenommen.

3. Ziel der Arbeit war es außerdem, den Effekt von MCP-1 auf die Differenzierung zu intestinalen Makrophagen im „Organotypischen Kulturmodell“ (Kollagengelmodell) zu untersuchen. Hier wurden Kollagengelmodelle mit Ad5_MCP-1 transfizierten Fibroblasten hergestellt, in denen die Monozyten direkten Kontakt mit den Fibroblasten und somit mit dem Chemokin MCP-1 haben. Zum Studium einer Makrophagendifferenzierung im epithelfernen Bereich wurden Kollagengelmodelle mit nicht-transfizierten Fibroblasten erzeugt, auf denen erst nach Formation der Kollagengele mit Ad5_MCP-1 transfizierte Epithelzellen aufgebracht wurden. In diesem Fall kommt MCP-1 erst später und nur von der epithelialen Seite zum System.

2. Material

2.1 Herkunft von Material und Geräten

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Geräte sind in den folgenden Tabellen unter Angabe ihrer Bezugsquelle zusammengefasst.

Material für die Zellkultur

AB-Serum (human)	Abteilung für Hämatologie/Onkologie, Universitätsklinikum Regensburg
Accutase	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
Amphotericin B	Squibb-von Heyden GmbH, München
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Agarose	Difco, Detroit, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)</i>	Biochrom, Berlin
<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)</i> , Pulver	PAN Systems, Aidenbach
Fötale Kälberserum (FCS)	PAN Systems, Aidenbach
Gentamycin	Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen
Gewebekulturflasche	Greiner, Solingen
Kollagen I (<i>from rat tail</i>)	Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen
Multiwell-Kulturplatten 96-, 6-well	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Natriumpyruvat	Biochrom, Berlin
Nicht-essentielle Aminosäuren	Biochrom, Berlin
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco, Life Technologies, Paisley, Schottland
Penicillin/Streptomycin	PAN Systems, Aidenbach
Polystyrenröhrchen 15,50 ml	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg

Trypanblau	Biochrom, Berlin
Trypsin/EDTA-Mischung	Biochrom, Berlin

Geräte für die Zellkultur

Brutschrank Heraeus 6000	Sepatech, Osterode
Durchlichtmikroskop	E. Leitz, Wetzlar
Neubauer- Zählkammer	Brand, Wertheim
Sterilbank Lamin Air HSB 2472 S	Sepatech, Osterode

Materialien und Geräte für die Durchflusszytometrie

Durchflusszytometer Coulter® EPICS® XL-MCL	Coulter Immunotech, Krefeld
Megafuge 1.0 R	Heraeus Sepatech, Osterode
Polytyren Röhrchen	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Trägerflüssigkeit Isoton® II	Coulter Immunotech, Krefeld

Sonstige Materialien

Aceton	Merck, Darmstadt
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) Mounting Medium	Vectashield®; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA
Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Faramount (Eindeckelmedium)	Dako, Hamburg
Fötale Kälberserum (FCS)	PAN Systems, Aidenbach
Ziegenserum	Dako, Glostrup

Geräte

Absorptionsspektrometer	Perkin Elmer, Weiterstadt
Analysenwaage, Sartorius analytica A 120 S	Sartorius, Göttingen
Biofuge 15 Zentrifuge	Heraeus Sepatech, Hanau
ELISA- Reader	MWG, Biotech, Dynatech, Denkendorf
Kryostat	Leitz, Wetzlar
Megafuge Zentrifuge	Heraeus Sepatech, Hanau
Millipore Wasser-Filteranlage	Millipore, Eschhorn
Vortex	Heidolph, Kelheim
Waage Sartorius excellence E 1200 S	Sartorius, Göttingen
Wasserbad Liquitherm FV	Labora, Mannheim

Verbrauchsmaterial

Pipetten	Costar, Cambridge
Reaktionsgefäße (1,5ml; 2ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (15ml; 50ml)	Falcon, Heidelberg
Filtereinsätze für 6-well-Mikrotiterplatten	Millipore, Eschhorn
6-well-Mikrotiterplatten	Becton Dickinson, Heidelberg
48-well-Mikrotiterplatten	Becton Dickinson, Heidelberg
96-well-Mikrotiterplatten	Greiner Labortechnik, Solingen
Kanülen	Becton Dickinson, Heidelberg
Skalpell	pmf, Köln
Spritzen	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkulturflaschen	Falcon, Heidelberg

2.2 Fertigkombinationen von Biochemikalien

Die in der Arbeit vorliegenden Fertigkombinationen von Biochemikalien („Kits“) sind in unter Angabe der Bezugsquelle in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

BD Cytofix /Cytoperm TM Fixation/Permeabilization Solution Kit	BD Bioscience, Heidelberg
MCP-1-ELISA Kit	Biozol, Eching

2.3 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten kommerziell erhältlichen Antikörper sind in der folgenden Tabelle unter Angabe des Konjugats, des Spenderorganismus, des Klons und des Herstellers zusammengefasst.

<u>Antikörper</u>	<u>Konjugat</u>	<u>Spender</u>	<u>Klon</u>	<u>Hersteller</u>
anti- CD 14	TRICOLOR	Maus IgG2a monoklonal	TÜK4	Caltag Laboratories, San Francisco, USA
anti- CD 14	unmarkiert	Maus IgG2b	X-8	Acris, Herford
anti- CD 14	unmarkiert	Maus IgG2b κ	MOPC- 141	Sigma- Aldrich GmbH, Steinheim
anti- CD 14	FITC	Maus IgG2a monoklonal	RMO52	Immunotech, Hamburg
anti- CD 14	unmarkiert	Maus IgG2a κ monoklonal	RMO52	Immunotech, Hamburg
anti- CD 33	PE	Maus IgG2b monoklonal	MY9	Immunotech, Hamburg

anti -CD33	unmarkiert	Maus IgG2b monoklonal	MY9	Immunotech, Hamburg
anti- CD 68	FITC	Maus IgG1 monoklonal	KP1	Dako, Hamburg
anti- CD 68	unmarkiert	Maus IgG1 κ monoklonal	MOPC- 21	Sigma- Aldrich GmbH, Steinheim
anti- EP4	FITC	Maus IgG1 κ monoklonal	Ber-EP4	Dako, Hamburg
anti- EP4	unmarkiert	Maus IgG1 κ monoklonal	Ber-EP4	Dako, Hamburg
Anti-Maus IgG	Alexa Fluor 488	Ziege		Eugene, Oregon, USA
Anti-Maus IgG	Alexa Fluor 546	Ziege		Eugene, Oregon, USA

2.4 Nährmedien und Antibiotika

Die in dieser Arbeit verwendeten Medien für die Zellkultur sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Fibroblasten-Medium	Dulbecco`s modofied eagle medium (1 g/l Glucose)	500 ml
	Fötales Kälberserum (10%)	50 ml
	Nicht essentielle Aminosäuren (1%)	5 ml
	Natrium-Pyruvat (1%)	5 ml
	Penicillin/Streptomycin (1%)	5 ml
	Ciprofloxacin (2mg/ml)	5 ml
	Gentamycin (50mg/ml)	5 ml
	Amphotericin B (1mg/ml)	0,5 ml
	Vitamine (MEM-Vitamine 100x)	5 ml
HT-29- Medium	Dulbecco`s modofied eagle medium (1 g/l Glucose)	500 ml
	Fötales Kälberserum (10%)	50 ml
	Nicht essentielle Aminosäuren (1%)	5 ml
	Natrium-Pyruvat (1%)	5 ml
	Penicillin/Streptomycin (1%)	5 ml

QBI-293 A-Medium	Dulbecco`s modofied eagle medium High Glucose (4,5 g/l Glucose)	500 ml
	Fötales Kälberserum (10%)	50 ml
	Natrium-Pyruvat (1%)	5 ml
	Penicillin/Streptomycin (1%)	5 ml

2.5 Puffer

Lösungen für Immunhistochemie und Durchflusszytometrie

PBS (10x)	NaCl	80g
	KCl	2g
	Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	21,6g
	KH ₂ PO ₄	2g
	H ₂ O, pH 7,2 einstellen	

3. Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 HT-29

Diese Kolonkarzinomzellen wurden erstmals aus dem Primärtumor einer 44-jährigen Frau isoliert (69).

Die Zellen wurden in DMEM unter Zugabe von 10% fötalem Kälberserum, 1% Natriumpyruvat, 1% nicht-essentiellen Aminosäuren und 1% einer Penicillin/Streptomycin - Mischung kultiviert. Die Kultur erfolgte in einem Brutschrank mit einer Atmosphäre von 37 °C, 10% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit. Einmal pro Woche wurden die Zellen mit Hilfe einer 0,25%-igen Trypsinlösung (in PBS) durch 10-minütige Inkubation bei 37 °C vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst.

3.1.2 CCD-18 Co

Die CCD-18 Co Zelllinie ist eine humane Fibroblastenzelllinie, die erstmals aus dem normalen Kolon isoliert wurde (70).

Die Zellen wurden in DMEM unter Zugabe von 10% fötalem Kälberserum, 1% Natriumpyruvat, 1% nicht-essentiellen Aminosäuren, 1% einer Penicillin/Streptomycin - Mischung, Ciprofloxacin (2mg/ml), Gentamycin (50mg/ml), Amphotericin B (1mg/ml) und Vitaminen (MEM- Vitamine 100x) kultiviert. Die Kultur erfolgte in einem Brutschrank mit einer Atmosphäre von 37 °C, 10% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit. 1 Mal pro Woche wurden die Zellen mit Hilfe von Accutase durch 10-minütige Inkubation bei 37 °C vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst.

3.1.3 QBI-293 A

Die QBI-293 A Zellen (Qbiogene, Heidelberg, Germany) sind die älteste Zelllinie zur Aufzucht von rekombinanten adenoviralen Vektoren (71). Es wurde lange angenommen, dass es sich hierbei um eine embryonale Nierenzelllinie handle (HEK= Human Embryonic Kidney), neuere Ergebnisse weisen jedoch auf einen neuronalen Ursprung hin (72).

Die Zellen wurden in DMEM High Glucose (4.5 g/l) unter Zugabe von 10 % FCS, 1% Natriumpyruvat und 1 % einer Penicillin/Streptomycin - Mischung kultiviert. Die Kultur erfolgte in einem Brutschrank mit einer Atmosphäre von 37 °C, 10% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit. 1 Mal pro Woche wurden die Zellen mit Hilfe einer 0,25%-igen Trypsinlösung (in PBS) durch 10-minütige Inkubation bei 37 °C vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst.

3.2 Allgemeine Zellkulturtechniken

3.2.1 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurde ein spezielles Einfriermedium bestehend aus DMEM mit 20% FCS und 10% DMSO verwendet. Die Zellen wurden abtrypsiniert, zentrifugiert, gezählt (siehe unten) und in Einfriermedium resuspendiert (1×10^6 Zellen/ml). Die Zellsuspension wurde in spezielle Einfrierröhrchen gefüllt und über Nacht bei -80°C eingefroren. Zur Langzeitlagerung wurden die Röhrchen in einen Flüssigstickstofftank überführt.

3.2.2 Auftauen von Zellen

Das Auftauen von Zellen erfolgte durch kurzzeitige Wärmebehandlung des Einfrierröhrchens (37°C , 2 min). Anschließend wurden die Zellen sofort in vorgewärmtes Zellkulturmedium überführt und einmal abzentrifugiert, um das bei Raumtemperatur als Zellgift wirkende DMSO zu entfernen. Die Zellen wurden in frischem, 37°C warmem Zellkulturmedium wiederaufgenommen und in Kulturflaschen überführt.

3.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl einer Kultur wurde mikroskopisch mit einem Neubauer-Hämozytometer im Trypanblau-Ausschlusstest bestimmt. Hierbei wird ein bestimmtes Volumen an Zellsuspension mit Trypanblau gefärbt. Lebende Zellen erscheinen farblos, tote färben sich blau an. 10 µl der gefärbten Suspension werden in eine Kammer des Hämozytometers gefüllt und unter dem Mikroskop ausgewertet. Dabei muss die Zahl an lebendigen Zellen in den vier sich diagonal gegenüberliegenden und 16-fach unterteilten Quadranten bestimmt werden. Die Gesamtzahl der Suspension ergibt sich mit folgender Formel:

$$\frac{\text{Anzahl der Zellen}}{\text{Anzahl der Großquadranten}} \times \text{Volumen} \times \text{Verdünnung} \times 10^4 = \text{Anzahl der Zellen im Volumen}$$

3.3 Adenovirale Vektoren

Adenovirale Vektoren sind vielversprechende Vektoren für gentherapeutische Anwendungen bei zahlreichen angeborenen und erworbenen Erkrankungen. In niedriger Konzentration und Toxizität sind Adenoviren in der Lage *in vitro* und *in vivo* Genmaterial in verschiedene Zelltypen einzuschleusen. Ad5 hat bei einer Genomlänge von 36 kb eine Aufnahmekapazität von 1,8-2,0 kb. Bei der Verwendung von Deletionsmutanten können entsprechend größere DNA-Fragmente in das Ad-Genom eingeführt werden. Für den Gentransfer werden zur Zeit noch überwiegend Ad5-Vektoren verwendet, deren E1-Region deletiert ist, was zu replikationsdefekten adenoviralen Vektoren führt (73,74).

3.3.1 Herstellung der adenoviralen Vektoren

Die Herstellung der adenoviralen Vektoren erfolgte mit Hilfe des AdEasy™ System (75). Bei diesem System erfolgte zunächst die Klonierung der MCP-1 cDNA in den Transfervektor (pShuttle - CMV). Daran schließt sich die homologe Rekombination von Transfervektor mit pAdEasy-1 an. War die homologe Rekombination erfolgreich, so folgt zunächst eine Retransformation in einen rekombinationsinkompetenten *E. coli* - Stamm, damit die Plasmid- DNA sich ohne die Gefahr weiterer Rekombinationsereignisse vermehren lässt. Daran schließt sich die Linearisierung mittels *PacI* und die Transfektion in QBI-293 A Zellen an. In diesen wächst dann das Virus heran.

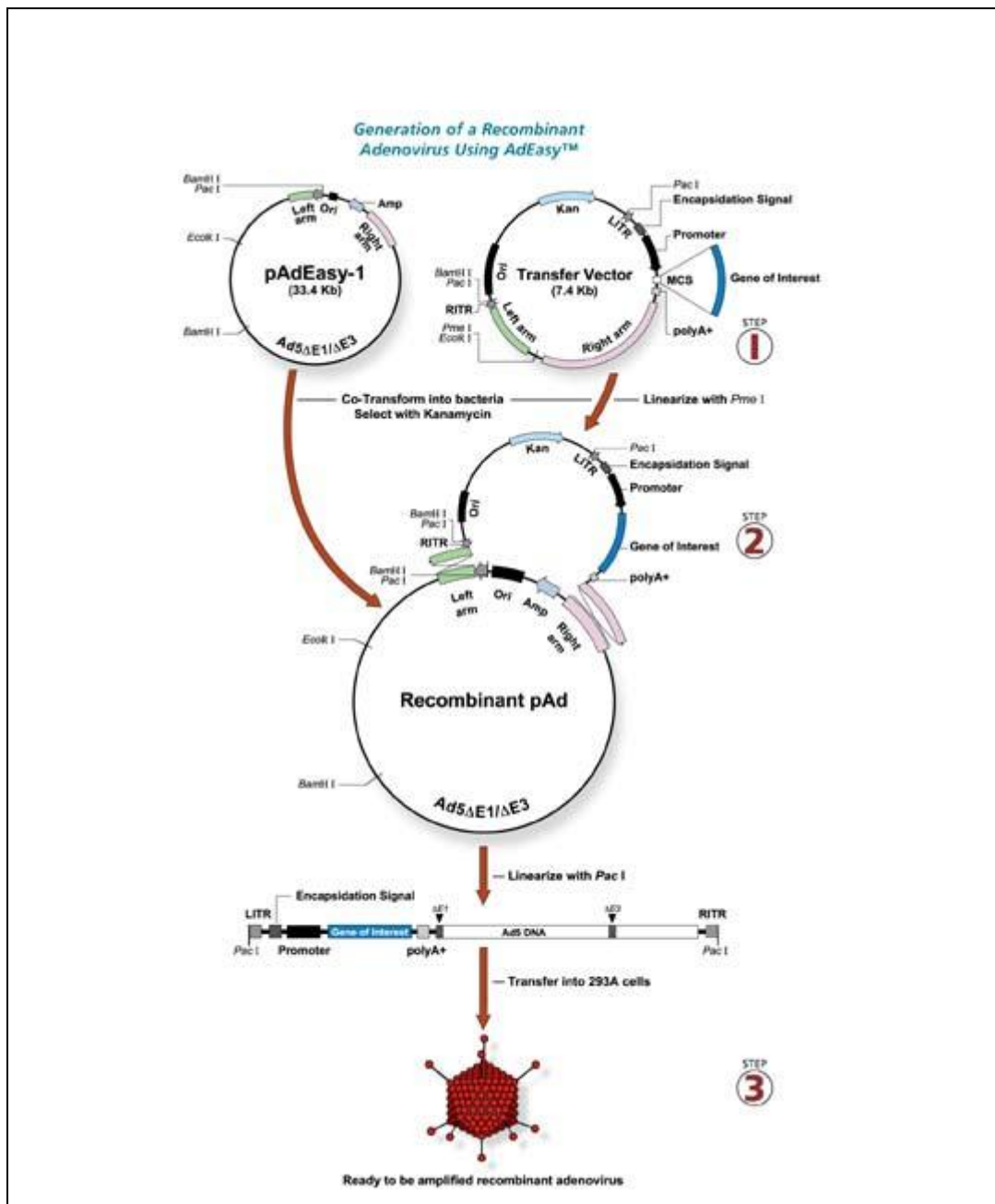


Abb.3.1: Herstellung rekombinanter Adenoviren mit dem AdEasy System.
(<http://www.qbiogene.com/products/adenovirus/adeasy.shtml>)

3.3.2 Transfektion von Zelllinien

1×10^6 HT-29 Zellen werden in einem *well* einer 6-well- Mikrotiterplatte in dem für die Zellkultur verwendeten Medium ausgesät. Die Zellen werden dann eine Stunde im Brutschrank mit einer Atmosphäre von 37 °C, 10% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit aufbewahrt, bis sie zu ca. 80 % adhären sind.

Zunächst wurde die optimale „*multiplicity of infection*“ (MOI) für HT-29 Zellen mit dem Ad5 Viruspartikel festgelegt. Hierfür wurden die Zellen mit einer verschiedenen Anzahl an Viruspartikeln für 48 Stunden inkubiert. Die Inkubation der HT-29 Zellen mit einer MOI von 10 oder MOI von 5 resultierte in einer Zelllyse nach 48 Stunden. Nach Transfektion mit MOI von 1, MOI von 1/2 sowie MOI von 1/4 zeigten sich die Zellen nach 48 Stunden lebensfähig und wurden für weitere Experimente verwendet. Wenn die HT-29 Zellen bis zu ca. 80 % adhären waren, wurde die entsprechende Menge an Ad5_MCP-1 Viruspartikeln und an leeren Kontrollviruspartikeln (Ad5_Null) aufgetaut und jeweils in 1 ml Serum-freien Medium verdünnt. Nach Inkubation der HT-29 Zellen für 1,5 Stunden mit der jeweiligen Viruslösung, wurden 2 ml Serum-freies Medium zugegeben. Die transfizierten Zellen wurden nach 48 Stunden geerntet und für die dreidimensionalen Zellkulturmodelle verwendet.

3.4 Dreidimensionale Zellkulturmodelle

3.4.1 Sphäroide

Unter Sphäroiden versteht man dreidimensionale Zellkulturen, in denen sich die Zellen kugelartig zusammenschließen. Sphäroide lassen sich aus primärem embryonalem Gewebe, Tumorgewebe und bestimmten Monolayerkulturen gewinnen. Um die Zellen dazu zu bringen, Sphäroide zu bilden, müssen sie in einer definierten Bewegung gehalten und daran gehindert werden, an der Unterlage anzuhaften. Dies kann durch verschiedene Methoden erreicht werden (76).

Züchten von Sphäroiden

Bei der hier gewählten „Liquid-Overlay-Technik“ (77) (Abb.3.2) wurden 96-well-Mikrotiterplatten mit Agarose-Gel beschichtet, um den Kontakt der Zellen mit der Kunststoffunterlage zu verhindern. 50 µl einer erhitzten semisteril hergestellten 1%-igen Agarose-Lösung wurden in jedes well der Mikrotiterplatte eingefüllt. Die beschichteten Mikrotiterplatten wurden ca. 15 min offen unter der Sterilbank getrocknet.

Die HT-29 Zellen, aus denen Sphäroide gezüchtet werden sollten, wurden abtrysiniert und gezählt. Je 4000 nicht transfizierte Zellen, 4000 mit dem Ad5_MCP-1 Virus transfizierte und 4000 mit dem Ad5_Null Virus transfizierte Zellen wurden in 200µl Medium in jedes well der Mikrotiterplatte eingefüllt. Die Zellen aggregierten innerhalb von ein bis zwei Tagen zu kleinen Sphäroiden. Nach zwei Tagen wurde die Hälfte des Mediums ausgetauscht.

Kokultur mit Blutmonozyten

Nach fünftägiger Kultur wurden die Sphäroide dreimal mit serumfreiem Medium gewaschen. Dazu wurden mit Hilfe eines Absaugschlauches jeweils ca. 100 µl Medium aus jedem *well* entfernt und 100 µl serumfreies Medium zugegeben. Nach dem dritten Waschschrift wurden die Sphäroide mit je 40 000, 4 000, 400 und 40 frisch isolierten Blutmonozyten kokultiviert. Nach 24 Stunden, drei und sieben Tagen wurden ein Teil der Sphäroide in Tissue-Tek eingebettet und für immunhistochemische Färbungen bei -80 °C eingefroren.

Die restlichen Sphäroide wurden mit Hilfe von Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA) in Zellsuspensionen aufgelöst, um diese für eine durchflusszytometrische Analyse zu verwenden.

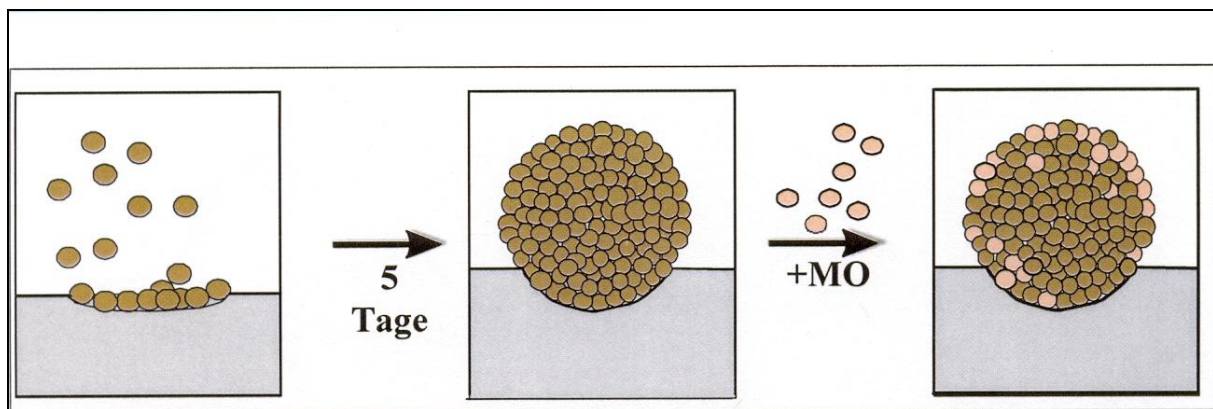


Abb. 3.2: Schematische Darstellung zum Züchten von Sphäroiden

3.4.2 Kollagengele

Zum Herstellen dreidimensionaler Kollagengele wurde säurelösliches Kollagen I (isoliert aus Rattenschwänzen) verwendet. Das lyophilisierte Typ I Kollagen (5mg/ml) wurde über Nacht unter Schütteln bei 4 °C in steril filtrierter 0,05% Essigsäure gelöst. Filtereinsätze für 6-well-Platten wurden mit einer Mischung aus gelöstem Kollagen I (Endkonzentration: 1,5 mg/ml), Dulbeccos modified Eagle Medium (DMEM), fötalem Kälberserum (FCS) und 0,1 N NaOH beschichtet (1ml/Filter). Die beschichteten Filtereinsätze wurden 30 min unter der Sterilbank getrocknet.

Fibroblasten der CCD-18Co Zelllinie wurden mit Accutase von den Zellkulturgefäßen abgelöst, gezählt und in DMEM, versetzt mit 30% FCS und 2% humanem AB-Serum, resuspendiert. Es wurden nicht-transfizierte, mit dem Ad5_MCP-1 Virus transfizierte und mit dem leeren Ad5_Null Virus transfizierte Fibroblasten verwendet. Die Fibroblasten wurden im Verhältnis 1:1 mit frisch elutrierten Blutmonozyten gemischt ($4,5 \times 10^5$ Fibroblasten + $4,5 \times 10^5$ Monozyten pro Filtereinsatz). Diese Zellsuspension wurde mit einer Lösung aus Kollagen I (Endkonzentration 1,5 mg/ml), DMEM und 0,1 N NaOH gemischt. Jeweils 3 ml dieser Mischung wurden in die beschichteten Filter eingefüllt. Die Kollagen-Lösungen wurden für fünf Tage bei 37 °C in einer 10%-igen CO₂- Atmosphäre inkubiert.

Innerhalb von fünf Tagen bildeten sich aus der Kollagen-Lösung stabile, dreidimensionale Aggregate (*Abb.3.3*). Das Medium wurde aus den Filtern entfernt und 1×10^6 intestinale Epithelzellen wurden auf der Oberfläche jedes Gels ausgesät. Auf die Kollagengele, die mit nicht-transfizierten Fibroblasten gezüchtet wurden, wurden jeweils nicht-transfizierte HT-29 Zellen, mit dem Ad5_MCP-1 Virus transfizierte und mit dem leeren Ad5_Null Virus transfizierte HT-29 Zellen ausgesät. Auf die Gele, die mit transfizierten Fibroblasten hergestellt wurden, wurden jeweils nicht-transfizierte HT-29 Zellen ausgesät. Um das Adhärenz der Zellen zu erleichtern, wurden die Aggregate für 30 min ohne Medium bei 37 °C in einer 10%-igen CO₂- Atmosphäre inkubiert. Nach 30 min wurden pro Filter 5 ml DMEM, versetzt mit 10% FCS und 2% humanem AB-Serum, eingefüllt und die Aggregate für weitere sieben Tage kultiviert. Nach dieser Zeit wurden die Aggregate geerntet, in Einfriermedium eingebettet und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

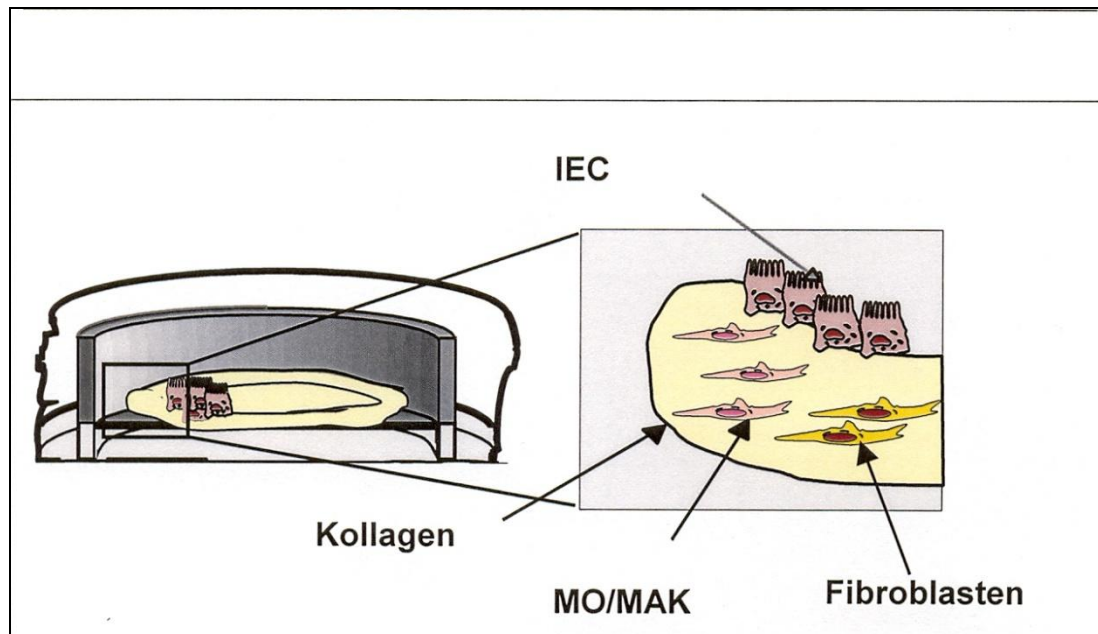


Abb.3.3: Schematische Darstellung des Kollagengelmodells

3.5 Immunhistochemie

Mit Hilfe der Immunhistochemie gelingen der Nachweis und die Lokalisation bestimmter Substanzen in Geweben und Zellen mittels Antikörpern. Der Nachweis beruht auf der Fähigkeit spezifischer Antikörper, zugehörige Antikörper zu erkennen und zu binden. Die Antigen-Antikörper-Bindung kann hierbei durch verschiedene Markierungsverfahren sichtbar gemacht werden (78).

3.5.1 Gefrierschnitte

Um die Präparate immunhistochemisch untersuchen zu können, wurden 5 µm dicke Schnitte bei -25 °C im Kryotom angefertigt und auf unbeschichtete Objektträger aufgebracht. Die Schnitte wurden 4-24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

3.5.2 Immunfluoreszenz

Bei der Immunfluoreszenz werden immunologische Reagenzien wie zum Beispiel Antikörper verwendet. Diese sind mit fluoreszierenden Farbstoffen konjugiert, die beim Auftreffen von Licht bestimmter Wellenlänge angeregt werden und dadurch längerwelliges Licht aussenden und damit leuchten. Bei der indirekten Immunfluoreszenz, wie sie hier durchgeführt wurde, wurde zunächst ein unmarkierter Antikörper gegen CD 14 bzw. CD 68 gebunden. In einem weiteren Schritt wurde ein sekundärer Antikörper, der an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war und gegen den primären Antikörper gerichtet ist, gebunden.

Die Gefrierschnitte wurden für 5 min in eiskaltem Aceton fixiert und anschließend kurz bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Die Schnitte wurden dreimal 5 min in PBS auf dem Schüttler gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen wurden die Schnitte für 30 min in 1% BSA/PBS mit 20 % Ziegsen Serum inkubiert. Alle folgenden Inkubationen wurden, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer durchgeführt. Nach

einem erneuten Waschschrift wurden die beiden Primärantikörper in der 1 %-igen BSA/PBS-Lösung verdünnt und auf die Schnitte aufgetragen. Der anti-CD 14 Antikörper und der zugehörige Isotyp IgG 2b kappa wurden im Verhältnis 1:100, der anti-CD 68 FITC Antikörper im Verhältnis 1:125 und der entsprechende Isotyp IgG 1 kappa im Verhältnis 1: 250 zugegeben. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde. Nach erneutem Waschen der Schnitte wurde der jeweilige sekundäre Antikörper (goat anti-mouse Alexa 488 und goat anti-mouse Alexa 546) in einer 1:300 Verdünnung zugegeben und für 30 min in der Dunkelheit inkubiert. Nach dreimaligem Waschen unter Lichtschutz wurde Mounting Medium/ with Dapi aufgetragen, die Schnitte mit einem Abdeckglas bedeckt und bei 4°C bis zum Mikroskopieren aufbewahrt.

3.6 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können mehrere Parameter einer einzelnen Zelle bestimmt und dargestellt werden. Die Zellen werden hierzu über spezifische Rezeptoren oder Proteine (membranständig oder intrazellulär) mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die so markierten Zellen werden einzeln an einem Messpunkt vorbeigeführt, an dem sie den Fokus eines Laserstrahls passieren. Je nachdem mit welchem Fluoreszenzfarbstoff die Zellen markiert wurden, emittieren sie durch diese Anregung Licht distinkter Wellenlängen. Durchkreuzt eine Zelle den Laserstrahl, so resultiert außerdem, bezogen auf den einfallenden Lichtstrahl, zum einen ein Vorwärtsstreulicht, zum anderen ein Seitwärtsstreulicht. Fluoreszenz sowie gestreutes Licht werden zu Photomultipliern geleitet und detektiert. Die Intensität des Vorwärtsstreulichts (FS) gibt Auskunft über die Größe der Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (SS) wird orthogonal zum Strahlengang detektiert und liefert Informationen über die Granularität der Zelle. Die Emission der Fluoreszenzfarbstoffe wird wie das Streulicht im 90 ° Winkel zur Strahlenrichtung des Lasers gesammelt und mit Hilfe von dichroitischen Spiegeln und Interferenzfiltern in Spektralbereiche bestimmter Wellenlänge getrennt.

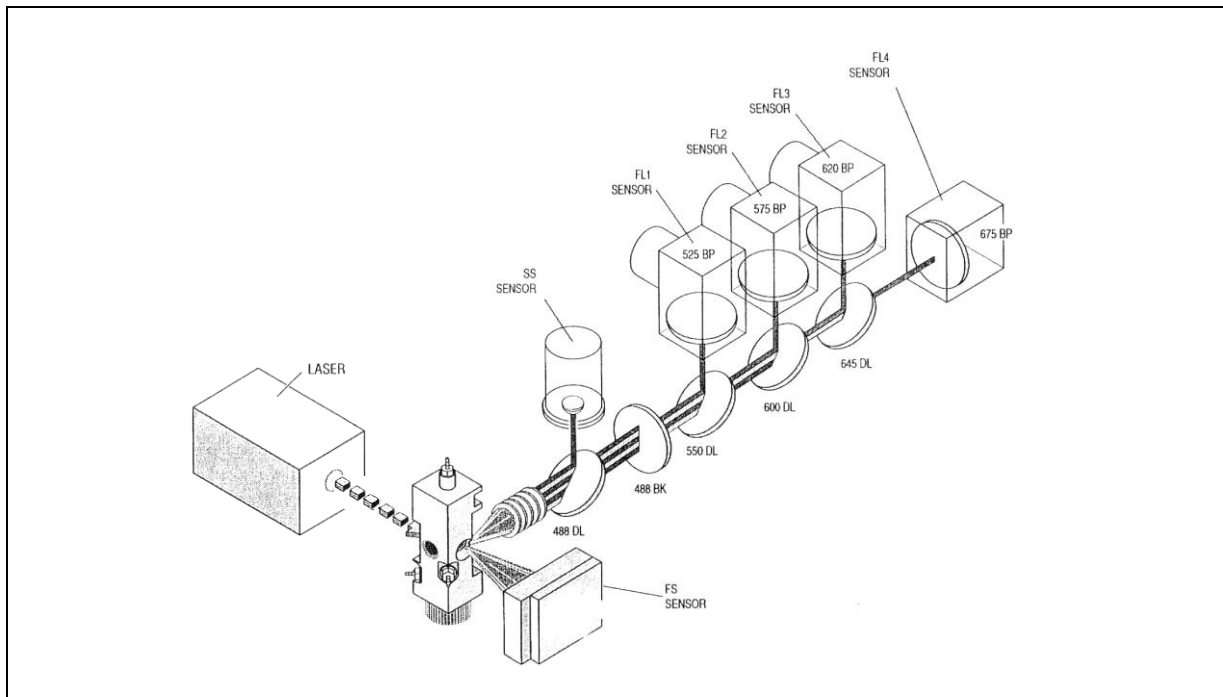


Abb.3.4 : Schematische Darstellung des optischen Systems des Durchflusszytometers Coulter EPICS XL-MCL (nach dem „user manual“ der Firma Coulter Immunotech, Krefeld. Vorwärtsstreulicht (FS), Seitwärtsstreulicht (SS), dichroitischer Spiegel (DL), Filter (BK) und Sensormessbereich (BP) in nm.

Werden bei einer Messung mehrere Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, die sich in ihrem Emissionswellenbereich überlappen, so muss die spektrale Überlappung mittels elektronischer Kompensation ausgeglichen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Fluoreszenzfarbstoffe verwendet:

Fluorochrom	Absorptionsmaximum (nm)	Emissionsmaximum (nm)	Fluoreszenz
FITC	495	525	grün
PE	488	575	orange-rot
TRICOLOR	488	600	rot

3.6.1 Färben der Zellen für durchflusszytometrische Untersuchungen

Zum Färben für die durchflusszytometrische Analyse wurden die Zellen mit einer Bloquierlösung (PBS/1% FCS) für 20 min inkubiert. Je 200 µl der zu untersuchenden Zellsuspension wurden in 1,5 ml Polypropylengefäße gefüllt. Es wurden 10 µl der direkt konjugierten Antikörper für die Oberflächenantigene CD14 und CD33 zugegeben und bei 4 °C für 20 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 500 µl PBS resuspendiert und die Proben dann am Durchflusszytometer gemessen.

Die Markierung mit dem intrazellulären MO/MAK-Marker CD 68 machte einen zusätzlichen Permeabilisierungsschritt erforderlich. Hierzu wurde das BD Cytofix/CytopermTM Fixation/ Permeabilization Solution Kit (BD Bioscience, Heidelberg) verwendet. Die Zellen wurden für 20 min ebenfalls bei 4 °C mit der Cytofix/Cytoperm- Lösung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit der Perm/Wash-Lösung wurden die Zellen mit dem direkt konjugierten Antikörper für den intrazellulären MO/MAK-Marker CD 68 bei 4 °C für wiederum 20 min inkubiert. Nach wiederholtem zweimaligem Waschen mit der Perm/Wash-Lösung wurden die Zellen in 100 µl Staining Buffer aufgenommen und durchflusszytometrisch untersucht.

3.7 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Prinzip eines Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Die Proteinabsorption auf der Oberfläche eines Biomaterials kann mit Hilfe des enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) untersucht werden. Dabei handelt es sich um einen zur Bestimmung festphasegebundener Antigene modifizierten immunologischen Test.

Grundlage des Verfahrens sind Wechselwirkungen zwischen dem spezifischen Antikörper und dem Antigen, denen das Schlüssel-Schloss-Prinzip zu Grunde liegt. Dabei besitzen bestimmte Bereiche des Antikörpers, die sogenannten Paratope, zu Oberflächenstrukturen des Antigens, den Epitopen, eine genaue Passform.

Die Bestimmung des immobilisierten Proteins erfolgt nach dem Prinzip des Sandwich-ELISA. Im ersten Schritt findet die Bindung des Proteins an der Festkörperoberfläche statt. Anschließend wird der primäre, gegen das präsentierte Antigen gerichtete Antikörper spezifisch gebunden. Nach Trennung der frei in der Lösung verbliebenen Reaktanden vom gebildeten Immunkomplex werden die gebundenen Antikörper im folgenden Reaktionsschritt durch enzymmarkierte, sekundäre Antikörper nachgewiesen. Nach Entfernung der ungebundenen Immunreaktanden erfolgt die Enzym/Substrat-Reaktion. Die gemessenen Extinktionen des dabei gebildeten Farbstoffes sind der Menge an umgesetztem Substrat proportional.

MCP-1- ELISA

Die MCP-1 Konzentration in den Zellkulturüberständen der HT-29- und Fibroblasten-Zelllinien wurde im ELISA gemessen.

Eine 96-Well-Polystyren-Mikrotiterplatte, beschichtet mit einem monoklonalem Antikörper aus der Maus gegen humanes MCP-1, wurde mit je 200 µl/Well der zu bestimmenden Proben und der Standardverdünnungsreihe für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Spülen der Platte mit Waschpuffer wurden je 200 µl/Well des sekundären Antikörpers zugegeben. Nach einer Stunde

Inkubationszeit wurde wieder dreimal gewaschen und pro Well 200 µl TMB Substratlösung für 20 min zugegeben. Die Inkubation erfolgte lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Abgestoppt wurde mit 50 µl Schwefelsäure H_2SO_4 . Die quantitative Erfassung der Konzentration an MCP-1, die proportional zur Farbintensität des entstandenen Farbkomplexes ist, wurde mit dem ELISA-Reader bei 450/540 nm durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Transfektion von HT-29 Zellen

Um die optimale „*multiplicity of infection*“ (MOI) für diese Zelllinie festzulegen, wurden HT-29 Zellen mit einer unterschiedlichen Anzahl von adenoviralen Partikeln transfiziert. Die optimale MOI für die Transfektion von HT-29 Zellen mit Ad5_MCP-1 lag in allen Versuchsreihen bei $\frac{1}{4}$. Eine Transfektion dieser Zelllinie mit einer höheren MOI von 1 (68, 79, 80), resultierte in einer erhöhten Zelllyse und einem Zerfall der Sphäroide nach 7 Tagen.

Nach 48 Stunden Inkubationszeit der HT-29 Zellen mit Ad5_MCP-1 zeigte sich eine erhöhte Konzentration an MCP-1 in den Zellüberständen. Die Analyse der Zellüberstände mittels ELISA erbrachte bei der Transfektion der Zellen mit MOI 1 eine erhöhte Konzentration an MCP-1 nach Transfektion mit Ad5_MCP-1 (990 ± 814 pg/ml) im Vergleich zur Transfektion mit Ad5_Null ($0,94 \pm 0$ pg/ml) und zur nicht-transfizierten Kontrolle ($0,95 \pm 0$ pg/ml, $n=3$).

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Transfektion der HT-29 Zellen mit einer deutlich geringeren MOI von $\frac{1}{4}$. Wie zu erwarten zeigte sich hier nach einer Inkubationszeit von 48h eine deutliche geringere Sekretion von MCP-1 im Vergleich zur Transfektion mit einer höheren MOI von 1. Die Konzentration von MCP-1 nach Transfektion mit Ad5_MCP-1 lag lediglich bei 28 ± 12 pg/ml, während die Produktion von MCP-1 nach der Transfektion mit Ad5_Null mit $0,63 \pm 0,73$ pg/ml und bei der nicht-transfizierten Kontrolle mit $0,44 \pm 0,34$ pg/ml gemessen wurde ($n=4$) (Abb. 4. 1b).

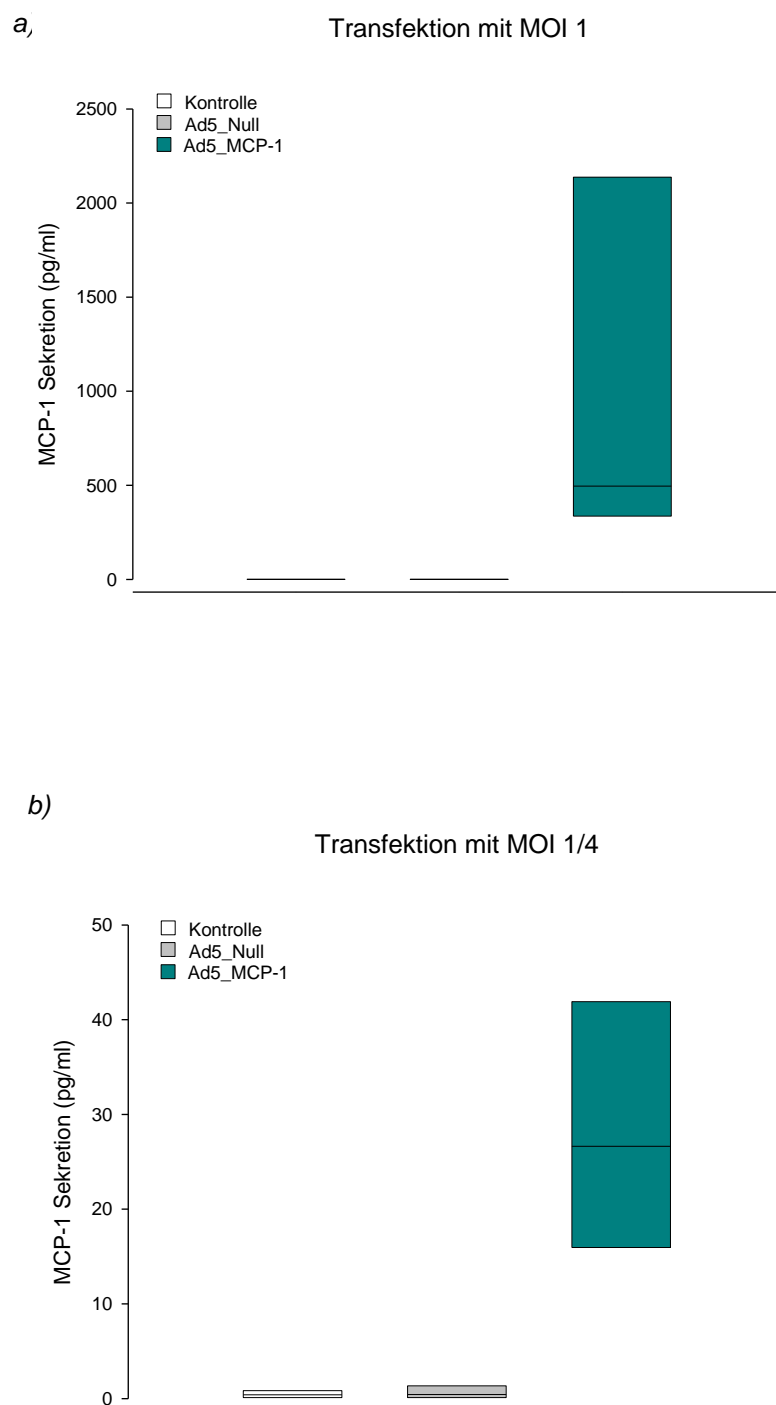


Abb.4.1: Quantifizierung der MCP-1 Konzentration in transfizierten Zellen

„-“ Median, „□“ Intervall zwischen dem 25%- und 75%-Quantil

a) MCP-1 Konzentration in Zellüberständen bei Transfektion mit MOI 1

b) MCP-1 Konzentration nach 48h nach Transfektion mit MOI 1/4

Wie bereits in Vorversuchen gezeigt wurde (68) zeigte sich auch hier nach Bildung der Sphäroide aus transfizierten HT-29 Zellen (MOI 1/4) und Kokultur der Sphäroide mit Blutmonozyten nach 7 Tagen eine stetig ansteigende Konzentration an MCP-1 in den Zellüberständen. Nach 48 h wurde die MCP-1 Sekretion im Vergleich zur nicht-transfizierten Kontrolle ($0,44 \pm 0,34 \text{ pg/ml}$) und zur Transfektion mit Ad5_Null ($0,63 \pm 0,72 \text{ pg/ml}$) in Ad5_MCP-1 transfizierten Zellen bei $28 \pm 12 \text{ pg/ml}$ gemessen. An Tag 1 lag die mittlere MCP-1 Konzentration in Ad5_MCP-1 transfizierten Zellen bei $253 \pm 143 \text{ pg/ml}$ während sie in der nicht-transfizierten Kontrolle bei $31 \pm 18 \text{ pg/ml}$ und in Ad5_Null transfizierten Zellen bei $29 \pm 9 \text{ pg/ml}$ gemessen wurde.

Nach 7 Tagen Kokultur konnte ein weiterer Anstieg der MCP-1 Konzentration in Ad5_MCP-1 transfizierten Zellen ($2222 \pm 160 \text{ pg/ml}$), in Ad5_Null transfizierten Zellen ($635 \pm 281 \text{ pg/ml}$) und in der nicht-transfizierten Kontrolle ($750 \pm 721 \text{ pg/ml}$) verzeichnet werden ($n=3$) (Abb.4.2).

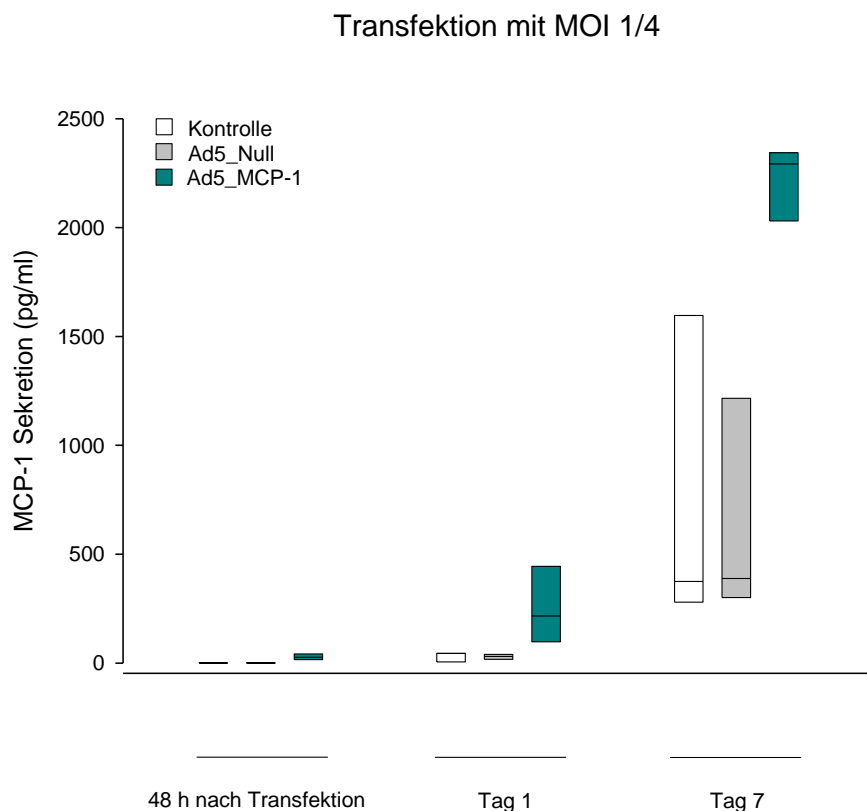


Abb.4.2: MCP-1 Konzentration in transfizierten Zellen (MOI 1/4) nach 48h, 1 Tag und 7 Tagen
 „-“ Median, „“ Intervall zwischen dem 25%- und 75%-Quantil

4.2 Phänotypische Charakterisierung intestinaler Makrophagen

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden frisch elutrierte Blutmonozyten verwendet, deren Phänotyp in vorausgegangenen Arbeiten bereits durchflusszytometrisch untersucht wurde. Der Oberflächenmarker CD14 wurde in 70-80% exprimiert (50). Als MO/MAK- Marker wurde der intrazelluläre Marker CD68 eingesetzt, da die Färbung mit dem bisher verwendeten Oberflächenantigen CD33 nicht zuverlässig gelang (Abb.4.3).

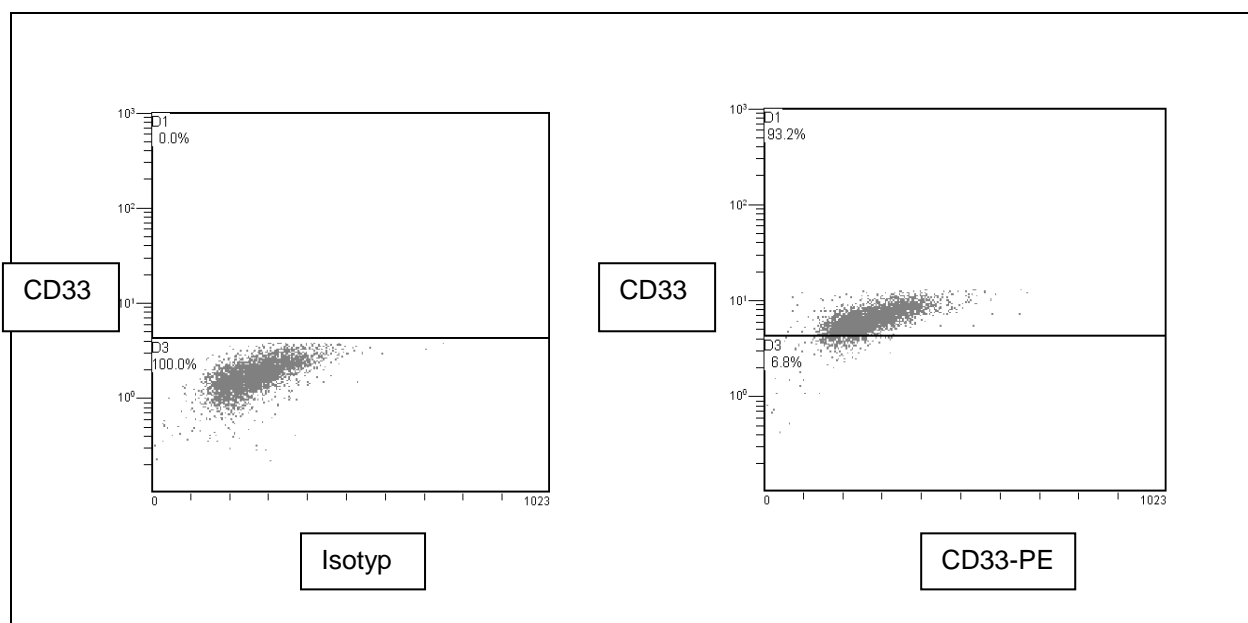


Abb.4.3: Durchflusszytometrische Analyse der für die Sphäroide verwendeten HT-29 Zellen ohne Kokultivierung mit Monozyten. Hier zeigt sich mit dem CD33 Antikörper eine unspezifische Färbereaktion. Im hier gezeigten Versuch waren 93 % der HT-29 Zellen CD33 positiv.

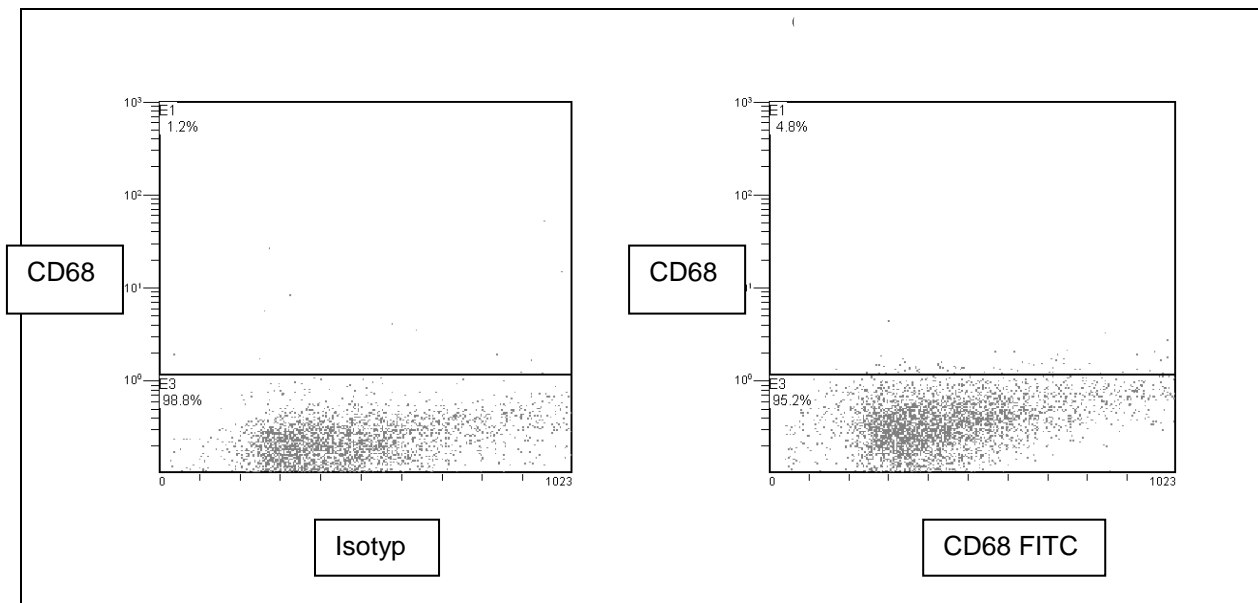


Abb.4.4: Durchflusszytometrische Analyse der für die Sphäroide verwendeten HT-29 Zellen ohne Kokultivierung mit Monozyten. Keine unspezifische Färbereaktion der HT-29 Zellen mit dem intrazellulären Marker CD68 FITC.

4.3 Differenzierung von intestinalen Makrophagen

Spoetl *et al* konnte bereits im Sphäroidmodell zeigen, dass die Interaktion mit intestinalen Epithelzellen eine Differenzierung der intestinalen Makrophagen ermöglicht. Nach 7 Tagen Kultivierung im dreidimensionalen organotypischen Zellkulturmodell wiesen die in Immunhistochemie und Durchflusszytometrie detektierten typischen Monozyten/Makrophagen Oberflächenantigene CD14, CD16, CD11b und CD11c eine Downregulierung auf (42). Spoetl *et al* gelang es zudem die bedeutende Rolle des Chemokins MCP-1 bei der Differenzierung von Blutmonozyten zu intestinalen Makrophagen nachzuweisen. Sie konnte zeigen, dass MCP-1, im Vergleich zur Kontrolle, eine deutlich vermehrte Migration von Monozyten in das dreidimensionale Sphäroidmodell bewirkt und den Differenzierungsweg zu intestinalen Makrophagen hemmt. Hier fand sich in den MCP-1 transfizierten multizellulären Sphäroiden eine erhöhte Expression von CD14 auf Monozyten/Makrophagen (68).

Dies konnte in den folgenden Versuchen nochmals gezeigt werden.

4.3.1 MCP-1 induziert die Migration von Monozyten in das multizelluläre Sphäroid

Die multizellulären Sphäroide wurden nach 24 Stunden, 3 und 7 Tagen durchflusszytometrisch analysiert. Hier wurde der Anteil an Monozyten /Makrophagen über die Koexpression der Oberflächenmarker CD14 und CD68 bestimmt. Nach 24 Stunden zeigten sowohl die Ad5_MCP-1 transfizierten Sphäroide als auch die nicht- transfizierten und die Ad5_Null transfizierten Sphäroide einen ähnlich geringen Anteil an CD14/CD68 positiven Monozyten/Makrophagen, die in das Sphäroid eingewandert sind. In den nicht-transfizierten Kontrollsphäroiden lag der Anteil nach 24 Stunden bei $2,3 \pm 1,1\%$, in den Ad5_Null transfizierten Aggregaten bei $1,2 \pm 0,7\%$ und in den Ad5_MCP-1 transfizierten Sphäroiden bei $3,7 \pm 1,2\%$. Nach 7-tägiger Kokultur fand sich in den nicht-transfizierten Kontrollaggregaten und den Ad5_Null transfizierten Sphäroiden ein geringer Anteil an CD14/CD68 positiven Monozyten /Makrophagen bezogen auf die Gesamtzellzahl (Kontrolle: $3,1 \pm 1,8 \%$

und Ad5_Null $2,5 \pm 1,1\%$), während die Transfektion der Zellen mit Ad5_MCP-1 in einer verstärkten Migration von Monozyten/Makrophagen in das multizelluläre Sphäroid resultierte ($15,8 \pm 7,9\%$, $n=2$).

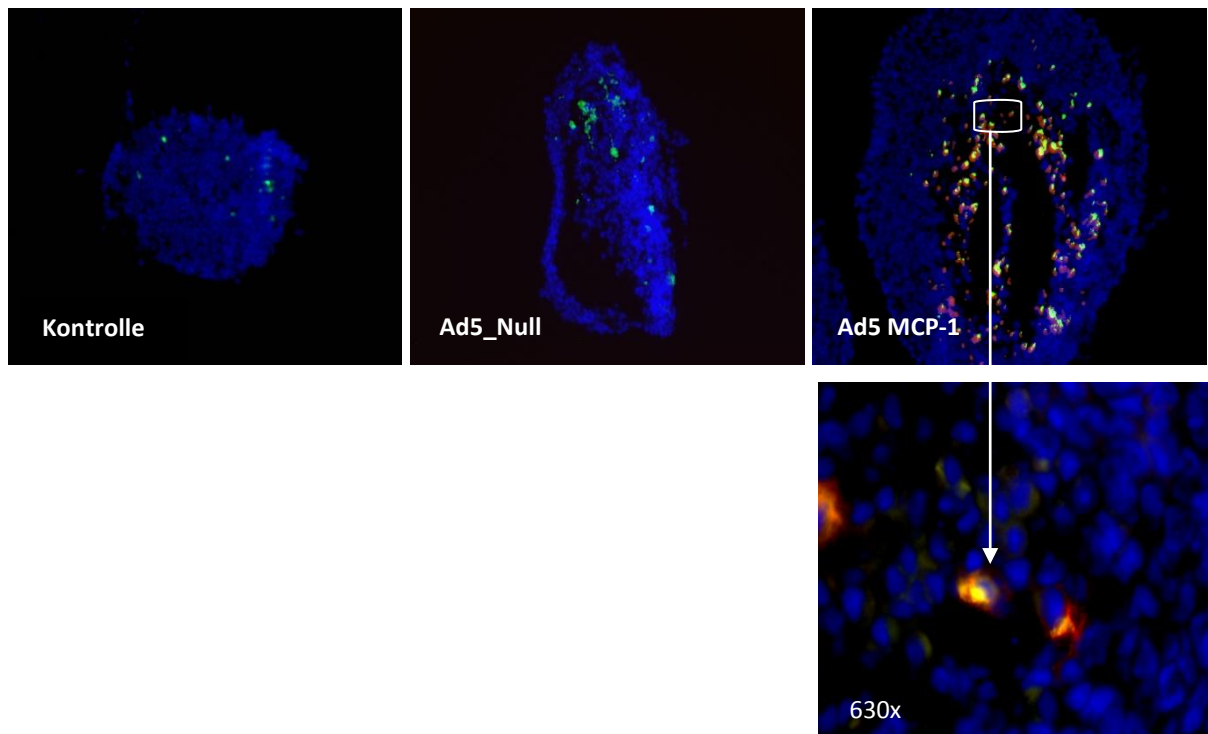


Abb. 4.5: Darstellung der Monozytenmigration in das multizelluläre Sphäroid mittels Immunfluoreszenzfärbung nach Kokultivierung mit Monozyten für insgesamt 7 Tage. Immunfluoreszente Detektion von CD14 (rot) und CD68 (grün), die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. An Tag 7 zeigen die nicht-transfizierten Kontrollaggregate und die Ad5_Null transfizierten Sphäroide nur einzelne CD68 positive Makrophagen, während die Ad5_MCP-1 transfizierten Sphäroide einen deutlich höheren Anteil an CD14/CD68 positiven Monozyten/Makrophagen aufweisen.

4.3.2 Der Einfluss von MCP-1 auf die Differenzierung von intestinalen Makrophagen

Die mit Ad5_MCP-1 transfizierten multizellulären Sphäroide wurden an Tag 1, Tag 3 und Tag 7 durchflusszytometrisch und immunhistochemisch analysiert und mit den mit Ad5_Null transfizierten und den nicht-transfizierten Kontrollaggregaten verglichen. Als Monozyten/Makrophagenmarker in der Durchflusszytometrie wurde das Oberflächenantigen CD68 verwendet. Abbildung 4.6 zeigt sowohl in den Ad5_Null transfizierten als auch in den nicht-transfizierten Kontrollaggregaten nach Einwanderung der Monozyten in dreidimensionalen Zellaggregate die Entwicklung eines anergen Phänotyp intestinaler Makrophagen.

An Tag 1 ergab sich in den nicht-transfizierten Kontrollaggregaten ein Anteil von $29 \pm 4\%$ CD14 positiver Zellen an der Gesamtzellzahl (A). Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich in den mit dem leeren Ad5 Virus transfizierten und Ad5_MCP-1 transfizierten Sphäroiden mit jeweils $26 \pm 5\%$ CD14 positiver Zellen ($n=3, C, E$).

Bereits nach dreitägiger Inkubation kam es zur deutlichen Abnahme der CD14 positiven Zellen in nicht-transfizierten ($8,3 \pm 3\%$) und Ad5_Null ($6,7 \pm 1\%$) transfizierten Sphäroide. Im Vergleich dazu zeigten die Ad5_MCP-1 transfizierten Sphäroide einen signifikant höheren Anteil an CD14 positiven Zellen ($35,7 \pm 10\%$, $p < 0.01, n=3$).

Die Transfektion der HT-29 Zellen mit dem Ad5_MCP-1 Virus resultierte in einer verminderten Differenzierung der Monozyten/Makrophagen zu intestinalen Makrophagen. Nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen fand sich ein nurmehr geringer Anteil an CD14 exprimierender Zellen in beiden nicht-Ad5_MCP-1 transfizierten Kontrollaggregaten ($0,4 \pm 0,1\%$, B,D) während nach Transfektion mit dem Ad5_MCP-1 Virus $34,3 \pm 14\%$ aller Zellen eine Expression von CD14 zeigten (F). Im Vergleich zu den nicht-transfizierten Kontrollaggregaten ergab sich hier ein signifikantes Ergebnis ($p < 0.024$, t-test, $n=3$).

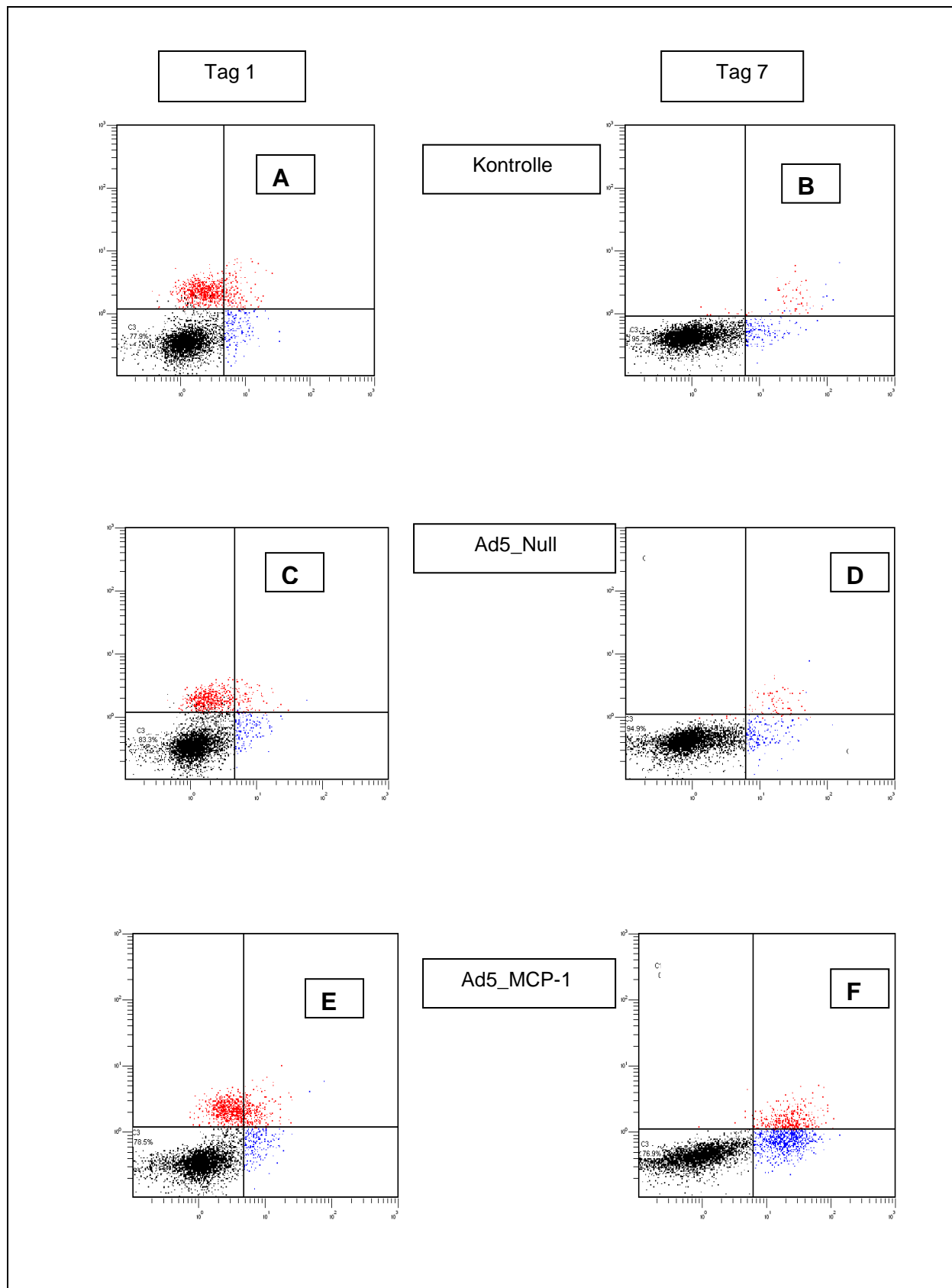


Abb.4.6: Durchflusszytometrische Analyse der in nicht-transfizierten, in Ad5_Null transfizierten und in Ad5_MCP-1 transfizierten Sphäroiden kultivierten MO/MAK. Die Sphäroide werden nach 1, 3 und 7 Tagen Inkubationszeit mittels EDTA aufgelöst und die Zellsuspension mit einem Tricolor konjugierten CD14-Antikörper (rot) und einem FITC-konjugiertem CD68-Antikörper (blau) gefärbt. Deutlich zu sehen ist der Verlust des CD14 Oberflächenantigens in nicht- Ad5_MCP-1 transfizierten Aggregaten nach 7 Tagen (B,D) im Vergleich zu Ad5_MCP-1 transfizierten Sphäroiden (F).

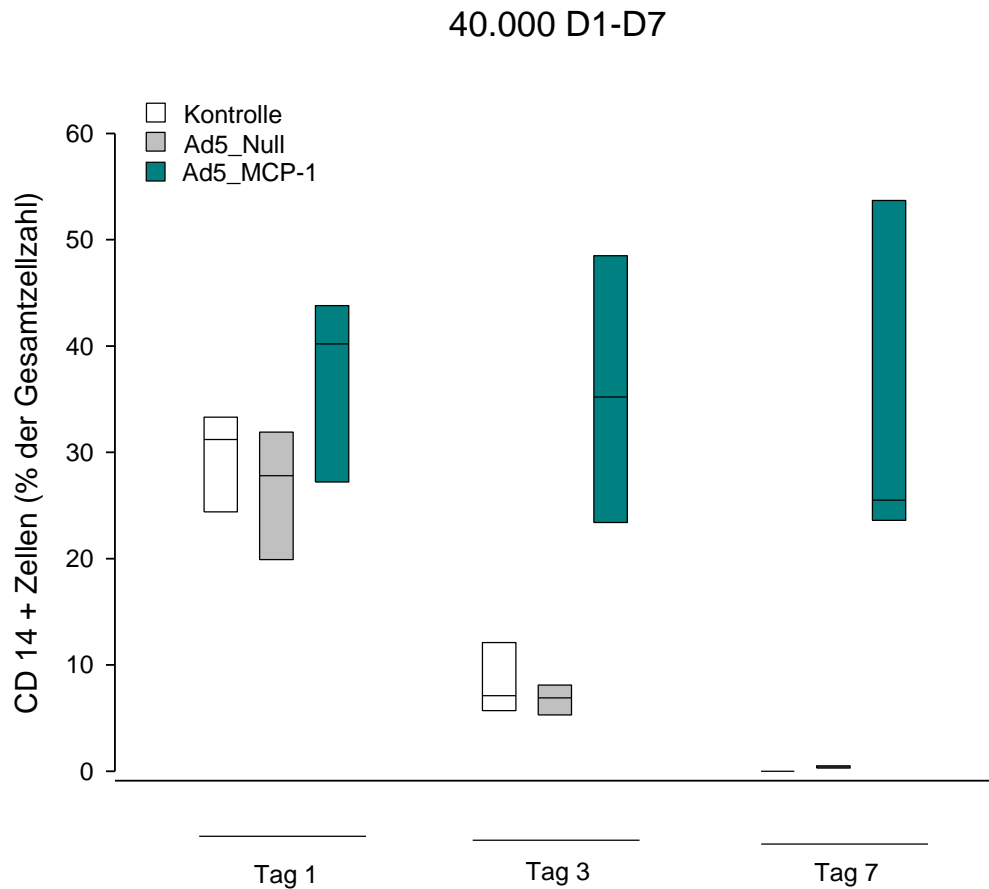
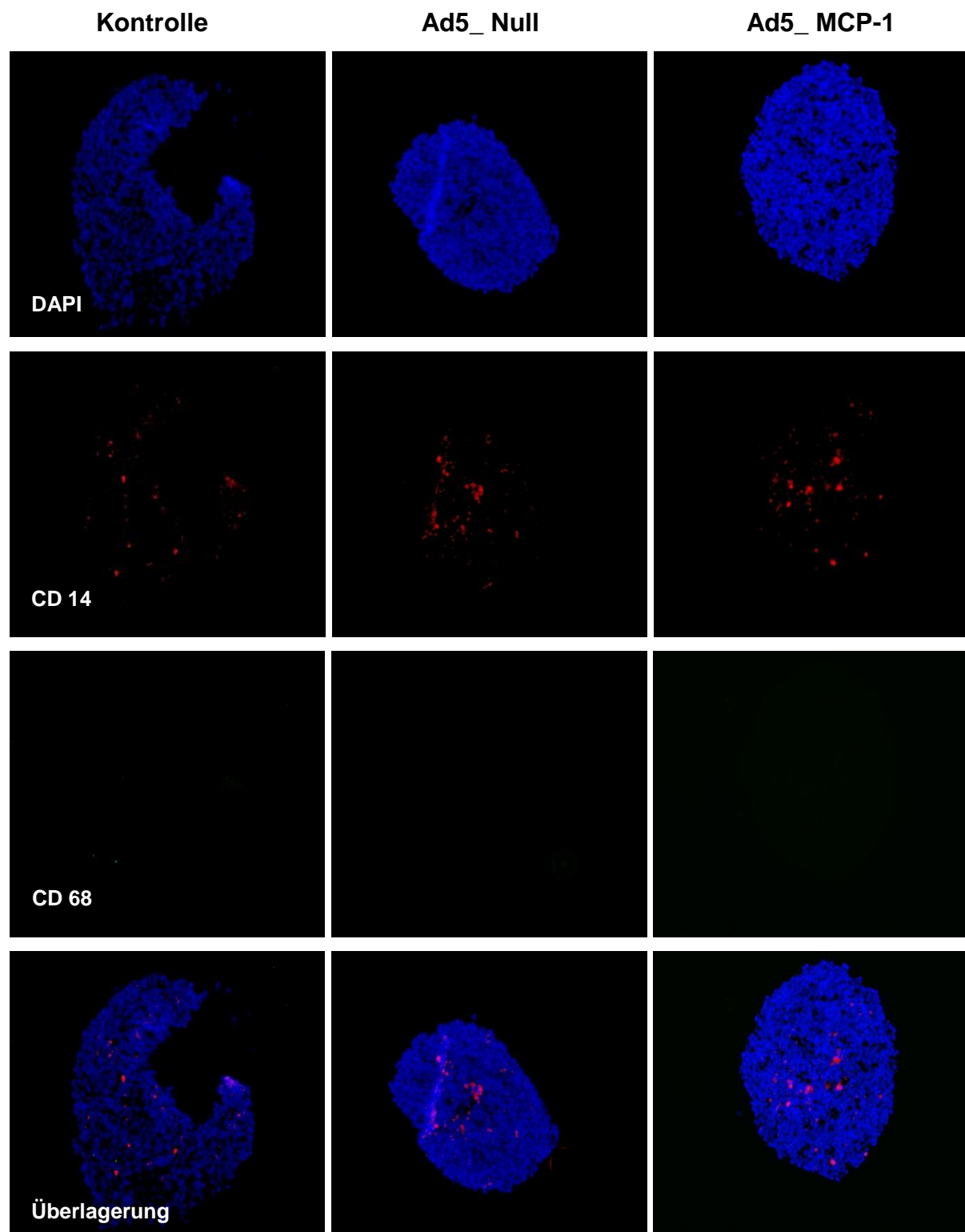


Abb.4.7: Anteil an CD14 positiven Zellen in nicht-transfizierten, Ad5_Null transfizierten und Ad5_MCP-1 transfizierten Sphäroiden nach ein-, drei- und siebentägiger Kultur mit je 40.000 MO/MAK. „-“ Median, „□“ Intervall zwischen dem 25%- und 75%-Quantil

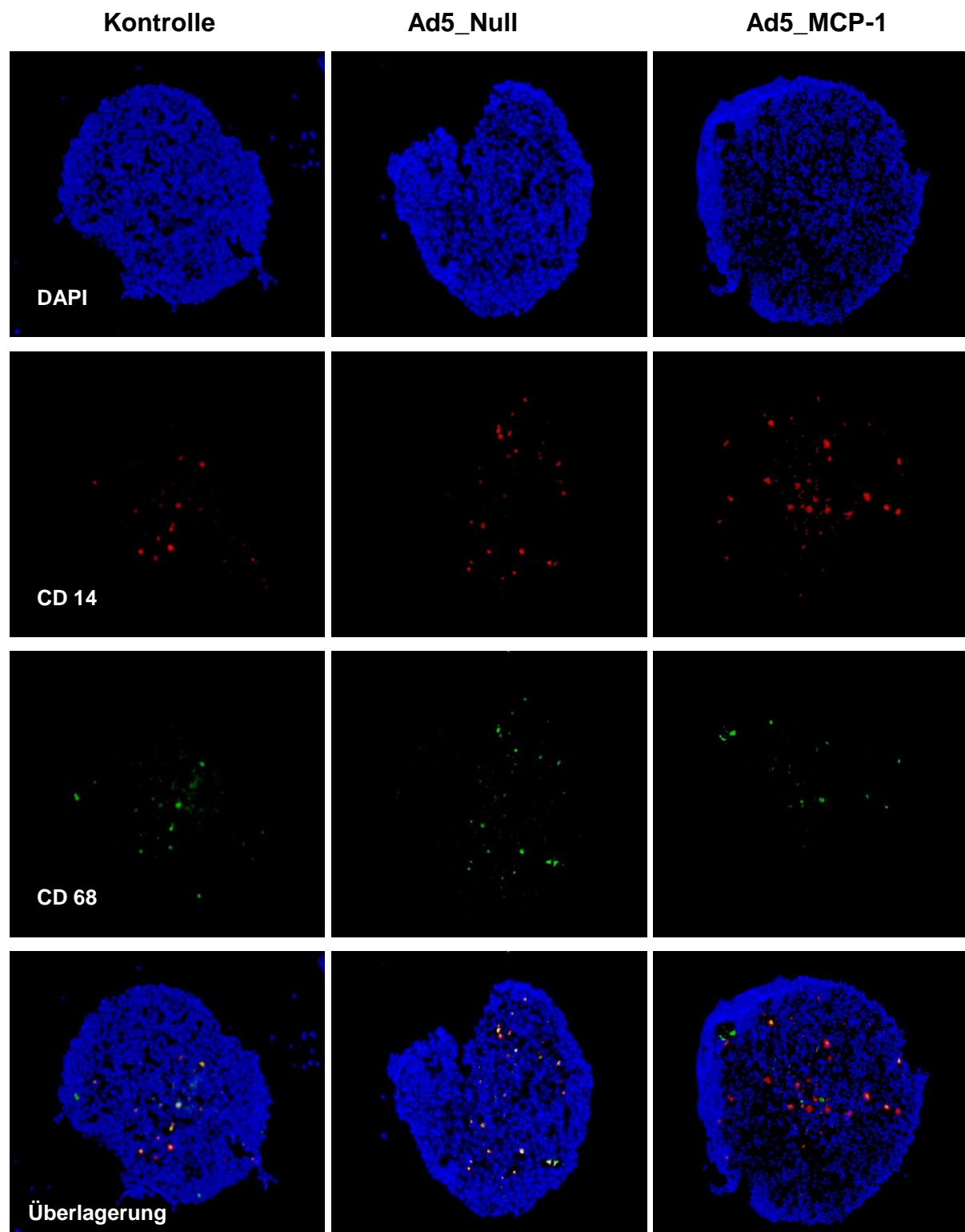
In der immunhistochemischen Analyse der Sphäroide konnte das Ergebnis der durchflusszytometrischen Auswertung bestätigt werden.

In der immunhistochemischen Doppelfärbung der Sphäroide mit CD 14 und CD 68 zeigte sich an Tag 1 eine in allen drei Vergleichsgruppen ähnlich hohe Expression von CD 14. Nach sieben-tägiger Inkubation waren in den nicht-transfizierten Kontrollaggregaten lediglich CD68 positive intestinale Makrophagen zu beobachten, während sich in den Ad5_MCP-1 transfizierten Sphäroiden eine Koexpression von CD14 und CD68 zu erkennen war (Abb.4.8).

Tag 1



Tag 3



Tag 7

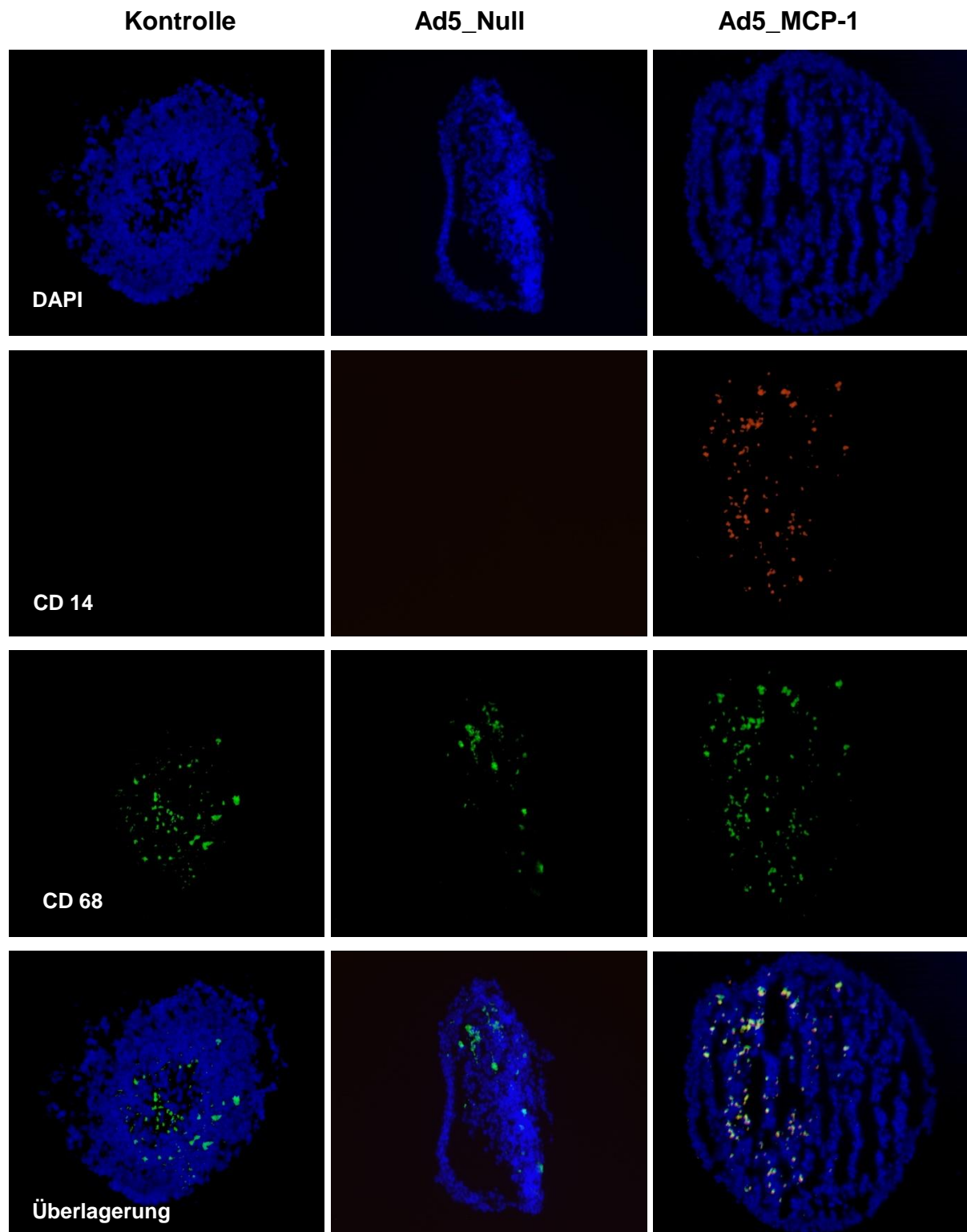


Abb. 4.8: Immunfluoreszenzfärbung multizellulärer Sphäroide nach Kokultivierung mit Monozyten für insgesamt 7 Tage.

Immunfluoreszente Detektion von CD14 (rot) und CD68 (grün), die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. In den nicht-transfizierten und Ad5_Null transfizierten Sphäroiden konnten nach 7 Tagen CD68 positive intestinale Makrophagen detektiert werden, die Expression von CD14 fehlt hier. In den Ad5_MCP-1 transfizierten Sphäroiden zeigte sich nach 7 Tagen eine Koexpression von CD14/CD68.

4.4 Untersuchung der Ursachen der Differenzierungsbehinderung durch MCP-1

Nachdem in den beschriebenen Versuchen gezeigt werden konnte, dass das Chemokin MCP-1 neben einer verstärkten Migration von Monozyten in das Sphäroid auch die Differenzierung zu intestinalen Makrophagen beeinflusst, soll in den folgenden Experimenten auf die Ursachen dieser Differenzierungsbehinderung näher eingegangen werden.

Mehrere Möglichkeiten dieser Differenzierungshemmung wurden bereits in Vorarbeiten diskutiert. Es wurde vermutet, dass die Monozytenzahl einen Einfluss auf die Differenzierung von Blutmonozyten zu intestinalen Makrophagen hat. Eine mögliche Erklärung wäre, dass im gesunden Darm nur ein kleiner Anteil an Monozyten, der in die Schleimhaut gelangt, fähig ist, den Differenzierungsweg zu intestinalen Makrophagen dort zu durchlaufen. In entzündlich veränderten Darmabschnitten dagegen, in denen zahlreiche proinflammatorische Zytokine und chemotaktische Mediatoren wie MCP-1 zu finden sind, wandern zahlreiche unspezifische Monozyten in die Darmmukosa ein, von denen die Subpopulation, die zu IMACs differenziert zu klein ist, um detektiert zu werden (68).

4.4.1 Einfluss der Monozytenzahl auf die Differenzierung zu intestinalen Makrophagen im Sphäroidmodell

Zur näheren Untersuchung der Auswirkung der Monozytenzahl auf die Differenzierung der Blutmonozyten zu intestinalen Makrophagen, wurde in den folgenden Experimenten eine Titrierung der zugegebenen Monozyten in das Multizelluläre Sphäroid Modell mit Reduktion der Monozytenzahl vorgenommen. Die aus 4000 HT-29 Zellen angezüchteten Sphäroide wurden mit je 40.000, 4.000, 400 und 40 frisch elutrierten Blutmonozyten kokultiviert.

Durchflusszytometrische Analysen zeigten, dass die Anzahl an zugegebenen Monozyten einen Einfluss auf die Differenzierung zu IMACS hat. Abbildung 4.9 zeigt die durchflusszytometrische Analyse von nicht-transfizierten, Ad5_Null transfizierten

und Ad5_MCP-1 transfizierten Sphäroiden nach sieben-tägiger Kokultur mit 40.000, 4.000 und 400 Monozyten. Bei Zugabe hoher Monozytenzahlen ist der Verlust der CD14 Expression auf den CD68 positiven Zellen der nicht-transfizierten Kontrollaggregate (A, C) im Vergleich zu den Ad5_MCP-1 transfizierten Sphäroiden deutlich zu erkennen (B, D). Dagegen liegt bei Kokultur der HT-29 Zellen mit geringer Monozytenzahl von 400 frisch elutrierten Blutmonozyten bei den transfizierten Sphäroiden wie auch bei den Kontrollaggregaten ein Verlust des Oberflächenantigens CD14 und somit keine Hemmung der Differenzierung vor (E, F). Eine Zugabe von sehr geringen Monozytenzahlen wie z.B. 40 Monozyten pro Sphäroid zeigt keine verwertbaren Ergebnisse, da nach sieben Tagen Kultur lediglich einzelne vitale Monozyten zu finden sind.

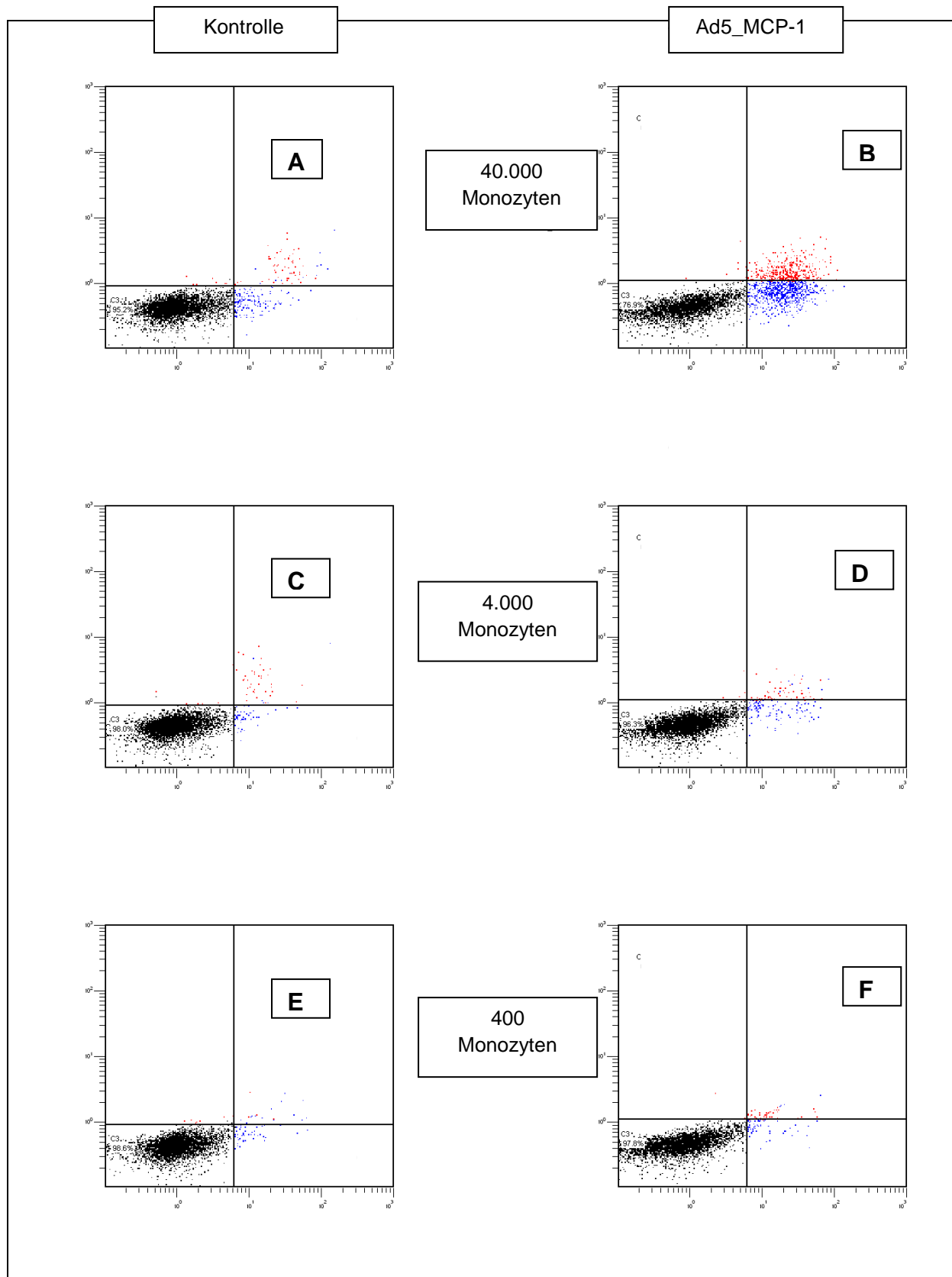


Abb.4.9: Durchflusszytometrische Analyse der nicht-transfizierten und Ad5_MCP-1 transfizierten Sphäroide an Tag 7.

Während bei Kokultur der Ad5_MCP-1 transfizierten Sphäroide mit hoher Monozytenzahl ein hoher Prozentanteil CD14/CD68 positiver Zellen beobachtet werden kann (B,D), zeigt sich unter Zugabe weniger Monozyten ein Verlust des Oberflächenmarkers CD14 (F).

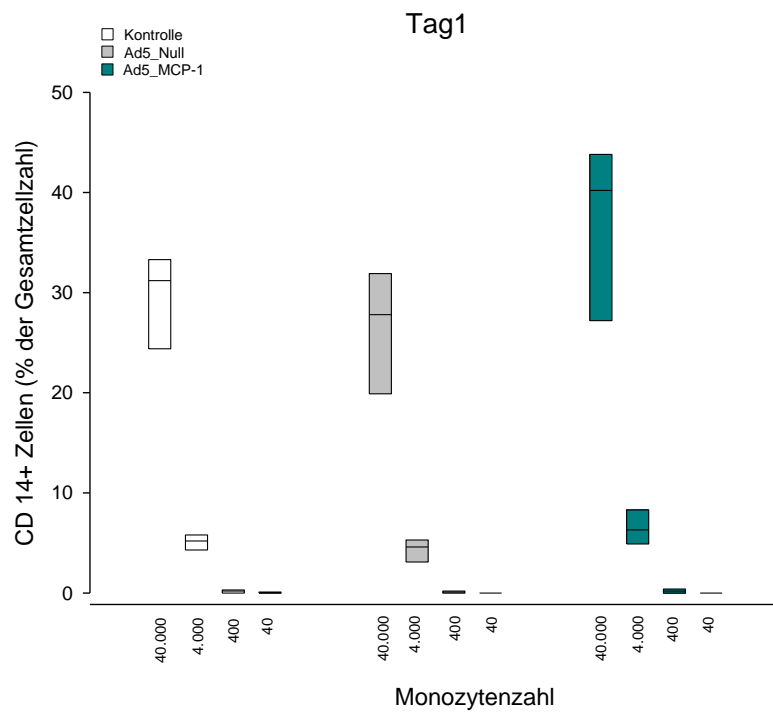
An Tag 1 zeigt sich nach Transfektion mit Ad5_MCP-1 ein im Vergleich zu den nicht-transfizierten und Ad5_Null transfizierten Sphäroiden ein leicht erhöhter Anteil an CD14 positiven Zellen bei Zugabe von 40.000 Monozyten ($40,6 \pm 10\%$) und 4.000 Monozyten ($6,5 \pm 1,4\%$). Bei Kokultur der nicht-transfizierten und Ad5_Null transfizierten Sphäroide mit 40.000 Monozyten lag der Anteil an CD14 positiven Zellen an der Gesamtzellzahl bei $29,6 \pm 4\%$ und $26,5 \pm 5\%$. Bei Zugabe von 4.000 Blutmonozyten pro Sphäroid wurden $5,1 \pm 0,6\%$ bzw. $4,3 \pm 0,9\%$ aller Zellen positiv für den Oberflächenmarker CD14 gemessen. Bei Kokultur von 400 Monozyten zeigten sowohl in den mit Ad5_MCP-1 ($0,2 \pm 0,16\%$), als auch in den mit Ad5_Null transfizierten ($0,1 \pm 0,08\%$) und den Kontrollaggregaten ($0,17 \pm 0,12\%$) nahezu nicht mehr messbare Werte CD14 positiver Zellen ($n=3$).

Nach drei- tägiger Kokultur mit 40.000 Monozyten ergab sich bereits ein signifikant erhöhter Anteil an CD14 positiven Zellen in Ad5_MCP-1 transfizierten Aggregaten ($35,7 \pm 10\%$) im Vergleich zu Ad5_Null transfizierten ($6,7 \pm 1\%$) und nicht transfizierten Sphäroiden ($8,3 \pm 3\%$). ($35,7 \pm 10\%$ versus $6,7 \pm 1\%$, $p < 0,02$, t-test, $n=3$). Eine statistische Signifikanz wurde ebenso bei Zugabe von 4.000 Blutmonozyten erreicht (Ad5_MCP-1: $5,8 \pm 2\%$ versus Kontrolle: $1,3 \pm 0,4\%$, $p < 0,03$, t-test, $n=3$). Bei Kokultur mit 400 Monozyten zeigte sich dagegen kein signifikanter Unterschied zwischen Ad5_MCP-1 ($0,4 \pm 0,28\%$ CD14 positive Zellen) und Ad5_Null ($0,2 \pm 0,08\%$ CD14 positive Zellen) transfizierten Kontrollaggregaten.

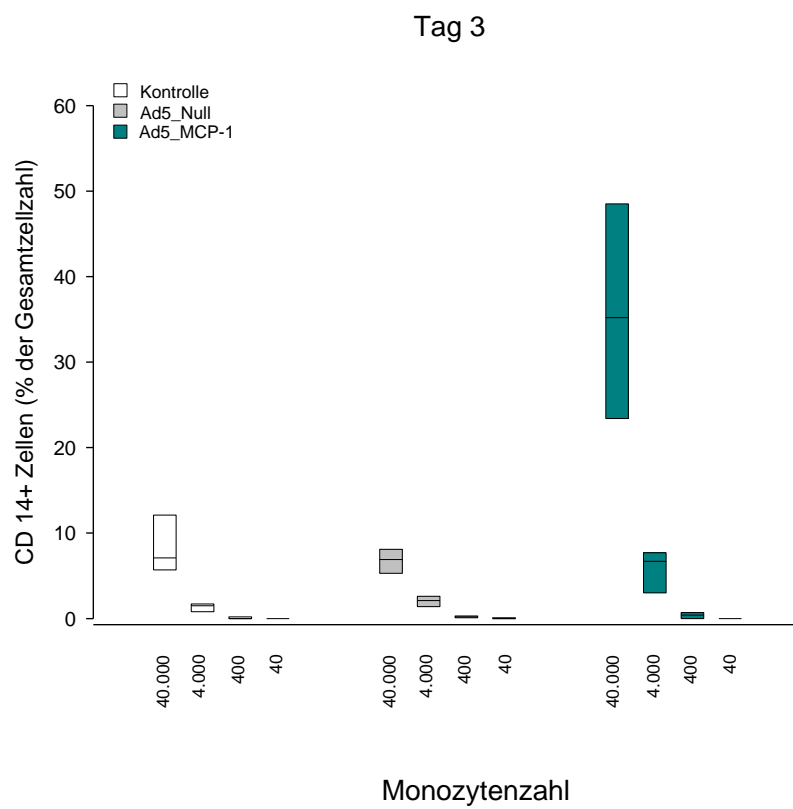
An Tag 7 ergab sich bei Zugabe von 40.000 Monozyten, wie bereits in Kapitel 4.3.2 gezeigt, in den Ad5_Null transfizierten sowie in den Kontrollaggregaten ein nahezu vollständiger Verlust des Oberflächenmarkers CD14, während dagegen in Ad5_MCP-1 transfizierten Sphäroiden ein hoher Anteil von $34,3 \pm 14\%$ CD14 positiver Zellen detektiert wurde. Unter Kokultur mit 4.000 Monozyten waren noch $5,1 \pm 3,6\%$ aller Zellen positiv für CD14. Die Zugabe einer geringen Monozytenzahl ergab auch an Tag 7 in allen drei Vergleichsgruppen einen CD14 positiven Anteil nahe null.

Demnach lässt sich festhalten, dass bei Zugabe einer hohen Monozytenanzahl im Sphäroidmodell und Anwesenheit des Chemokins MCP-1 eine Differenzierung der Blutmonozyten zu intestinalen Makrophagen verhindert wird, während bei Kokultur mit niedriger Monozytenzahl der Differenzierungsweg regelhaft verläuft.

a)



b)



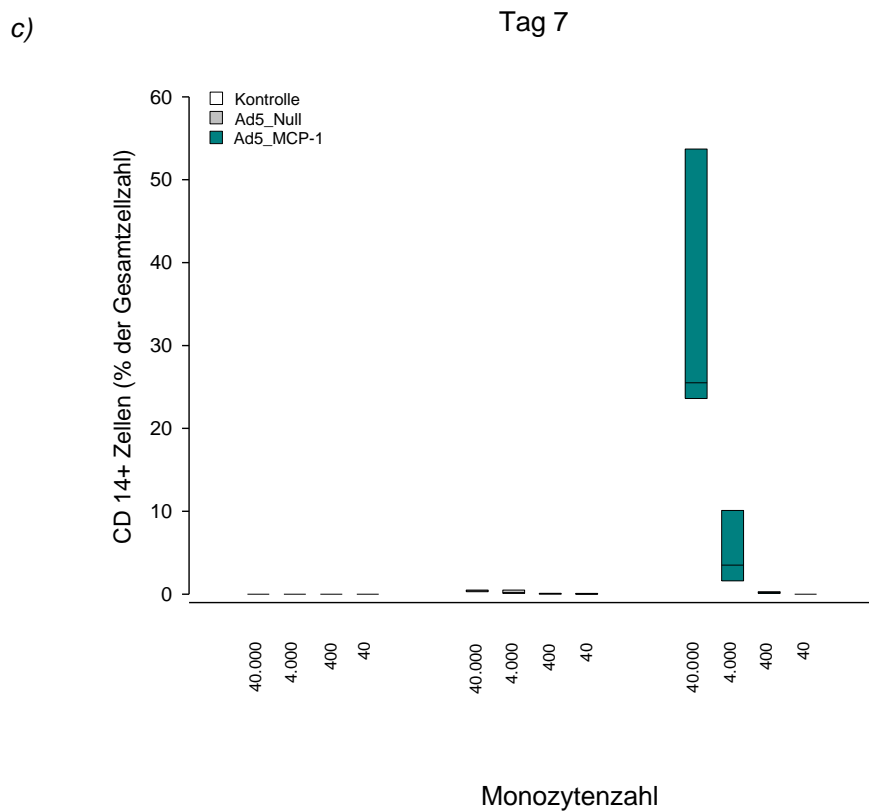
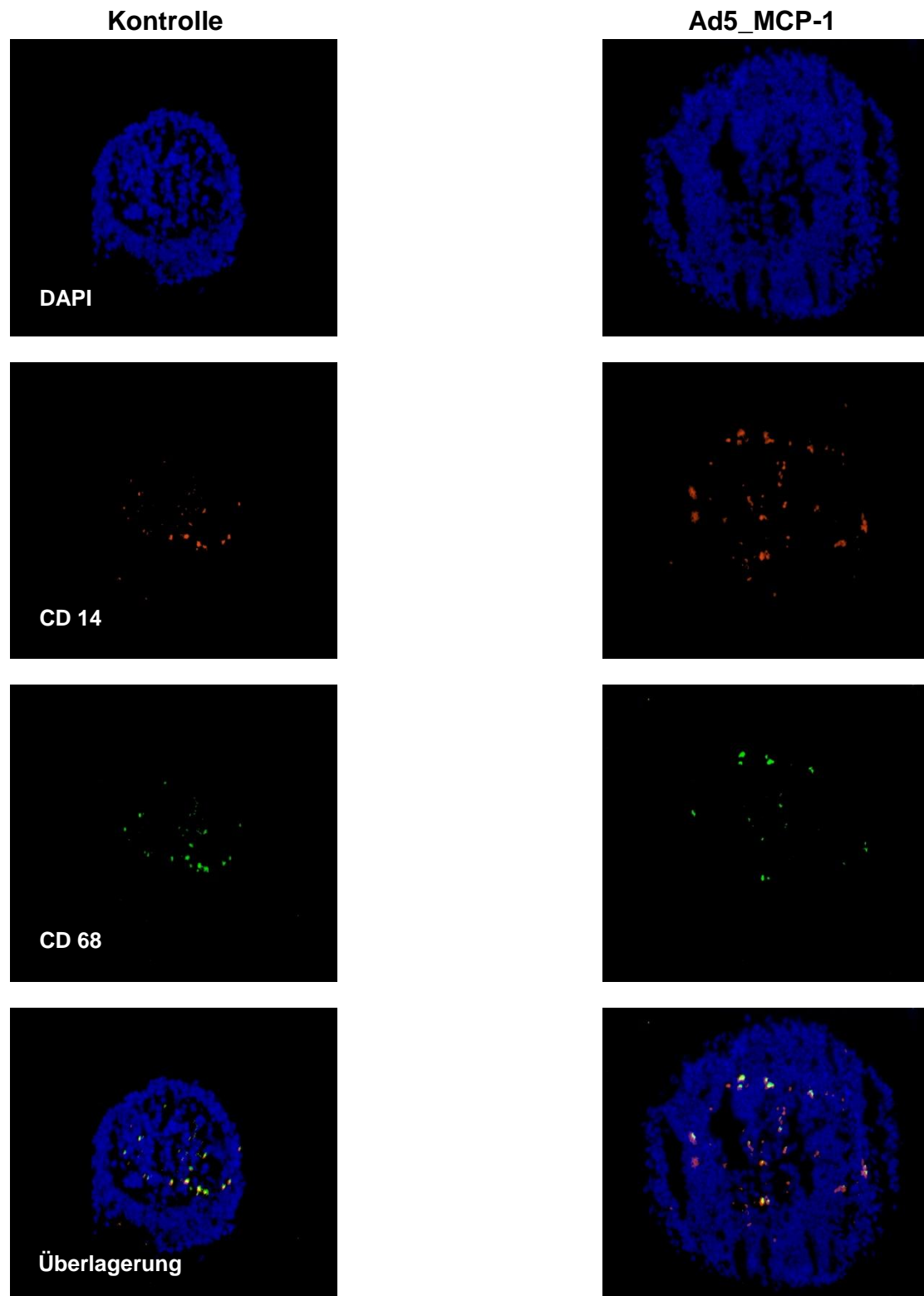


Abb.4.10 a)-c): Anteil der CD14 positiven Zellen in nicht-transfizierten, Ad5_Null transfizierten und Ad5_MCP-1 transfizierten Sphäroiden nach ein-, drei- und siebentägiger Kultur mit je 40.000, 4.000, 400 und 40 Monozyten.

„-“ Median, „“ Intervall zwischen dem 25%- und 75%-Quantil

In der immunhistochemischen Doppelfärbung der Sphäroide mit CD14 und CD68 konnte das Ergebnis der durchflusszytometrischen Auswertung bestätigt werden (Abb.4.11 und Abb. 4.12).

Inkubation der Sphäroide mit 4000 Monozyten für 3 Tage



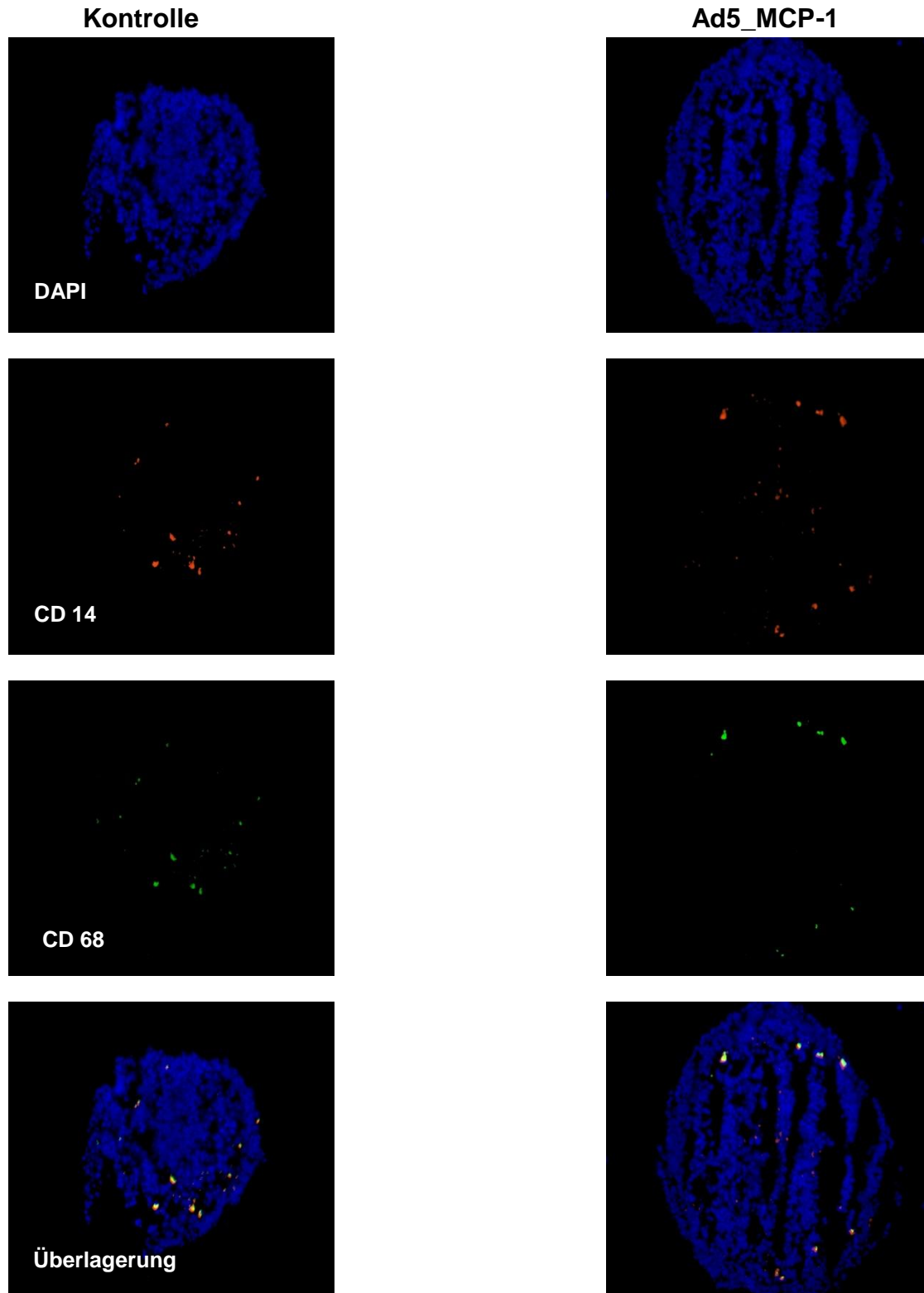
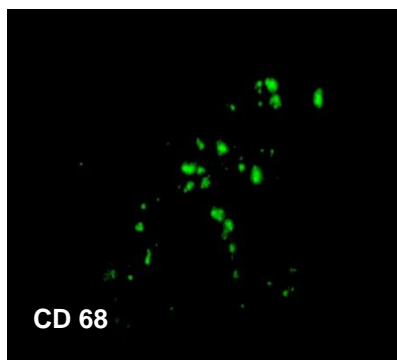
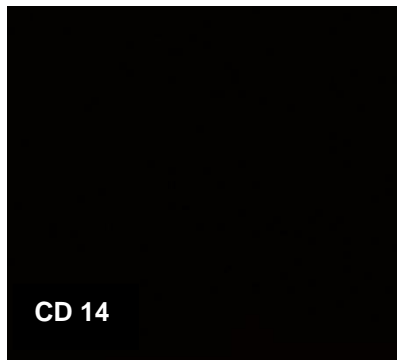
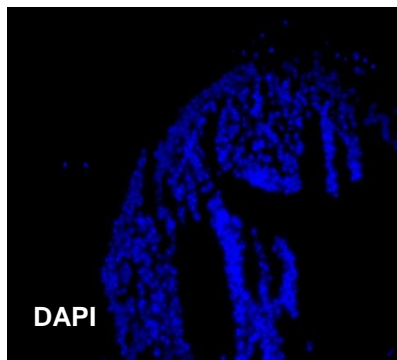
Inkubation der Sphäroide mit 400 Monozyten für 3 Tage

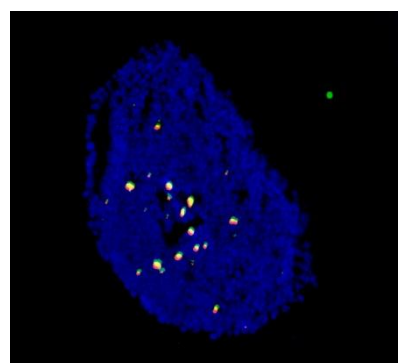
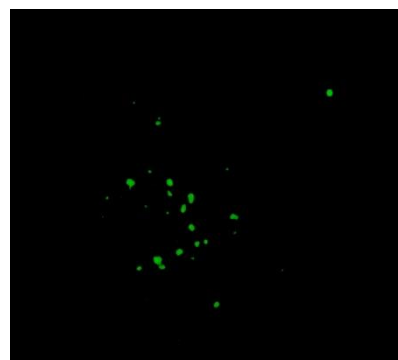
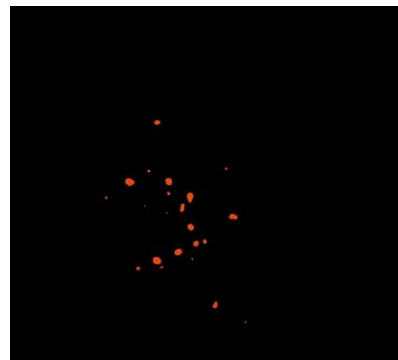
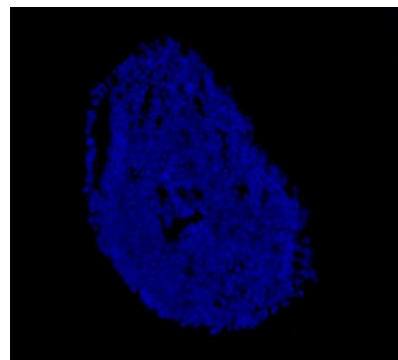
Abb. 4.11: Immunfluoreszenzfarbung multizellulärer Sphäroide nach Kokultivierung mit unterschiedlicher Monozytenzahl für 3 Tage. Immunfluoreszente Detektion von CD14 (rot) und CD68 (grün), die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die Ad5_MCP-1 transfizierten Sphäroide weisen nach dreitägiger Kultivierung mit 4000 Monozyten im Vergleich zu nicht-transfizierten Kontrollsphäroiden einen leicht erhöhten Anteil an CD14 positiven Monozyten auf. Nach Zugabe von 400 Monozyten lässt sich nach drei Tagen sowohl bei den nicht-transfizierten, als auch bei den Ad5_MCP-1 transfizierten Sphäroiden kein Unterschied in der Makrophagendifferenzierung erkennen.

Inkubation der Sphäroide mit 4000 Monozyten für 7 Tage

Kontrolle



Ad5_MCP-1



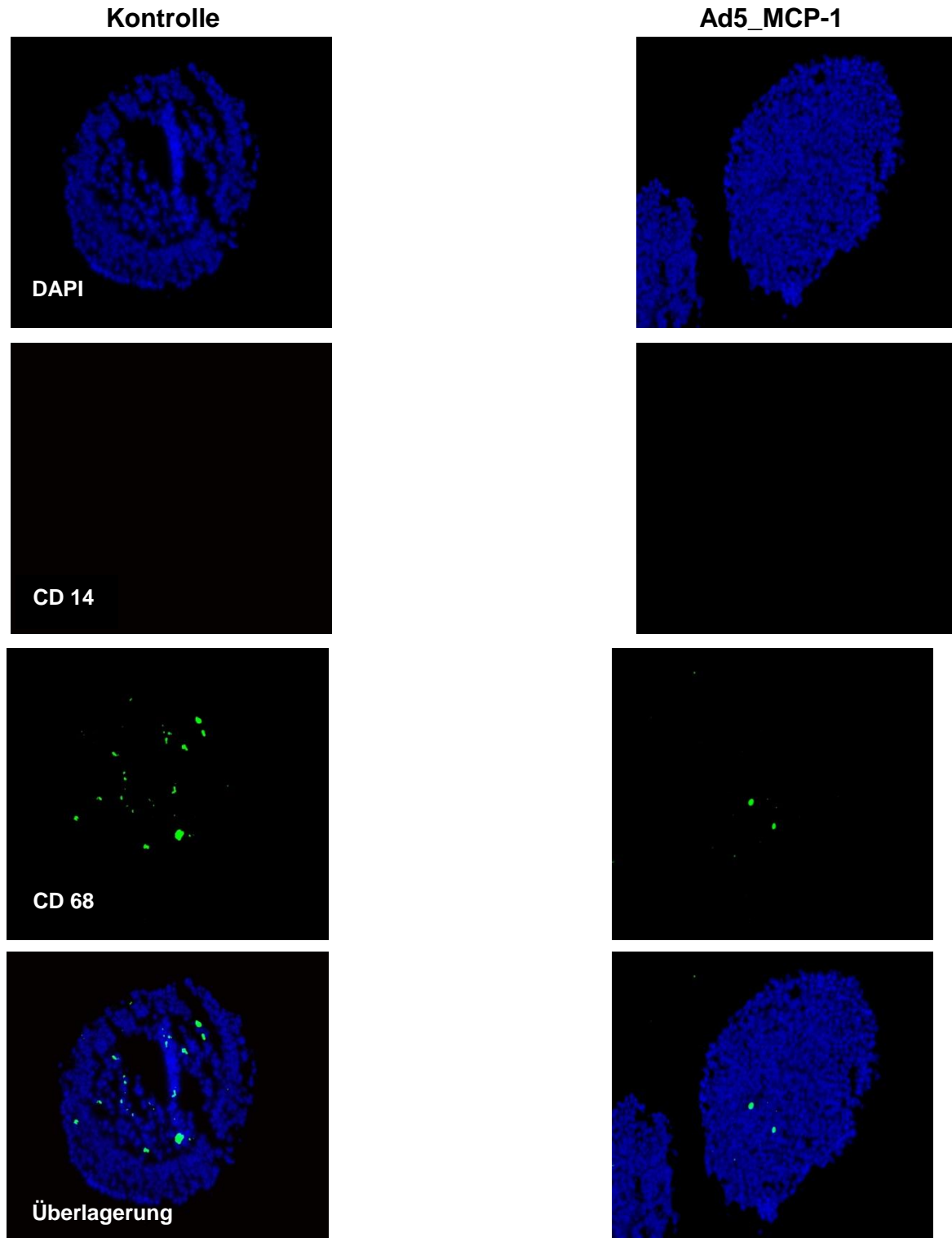
Inkubation der Sphäroide mit 400 Monozyten für 7 Tage

Abb. 4.12 : Immunfluoreszenzfärbung multizellulärer Sphäroide nach Kokultivierung mit unterschiedlicher Monozytenzahl für insgesamt 7 Tage. Immunfluoreszenz Detektion von CD14 (rot) und CD68 (grün), die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Am Tag 7 zeigt sich auch bei Zugabe von 4000 Monozyten eine erhöhte Expression des Oberflächenmarkers CD14 in Ad5_MCP-1 transfizierten Sphäroiden im Vergleich zu nicht-transfizierten Kontrollsphäroiden. Bei Kokultivierung mit 400 Monozyten färben sich in beiden Vergleichsgruppen nur einzelne CD68 positive Makrophagen.

4.5 Differenzierung im „Organotypischen Kulturmodell“

(Kollagengelmodell)

Zum Generieren der dreidimensionalen Kollagengelmodelle wurden, wie bereits in Vorarbeiten (47), Fibroblasten der Zelllinie CCD -18Co verwendet. Diese wurden sowohl mit dem Ad5_Null, als auch mit dem Ad5_MCP-1 Virus transfiziert (siehe Kapitel 3.3.2). Zusätzlich wurden als Negativkontrolle nicht-transfizierte Fibroblasten für die Herstellung der Kollagengele verwendet.

48 Stunden nach Transfektion wurden jedoch sowohl in den Überständen der nicht-transfizierten, als auch in den Überständen der Ad5_Null und Ad5_MCP-1 transfizierten Fibroblasten hohe Konzentration des Chemokins MCP-1 gemessen. Die Konzentrationen lagen ohne Transfektion bei 2955,4 pg/ml, nach Transfektion mit Ad5_Null bei 2977 pg/ml und nach Transfektion mit Ad5_MCP-1 bei 3008,2 pg/ml.

Abschließend konnte diese Fibroblastenzelllinie zur Bestätigung des Effekts von MCP-1 im „organotypischen Kulturmodell“ nicht verwendet werden.

5. Diskussion

5.1 Makrophagendifferenzierung im Sphäroidmodell

Intestinale Makrophagen kennzeichnen sich durch einen spezifischen anergen Phänotyp. Dieser zeichnet sich durch das Fehlen bestimmter Monozyten- und Makrophagenspezifischer Oberflächenmarker wie CD14, CD16, CD11b und CD11c aus, die eine Aktivierung der Zellen gegenüber luminalen Antigenen bewirken (31,34).

Spoettl *et al* konnte bereits in mehreren Vorarbeiten das dreidimensionale Zellkulturmodell zur *in vitro* Differenzierung intestinaler Makrophagen etablieren(68). Das Sphäroidmodell konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Hilfe weiterer Untersuchungsmethoden bestätigt und vertieft werden. Nach siebentägiger Inkubationszeit der Monozyten im dreidimensionalen Zellkulturmodell veränderten die Zellen durch Herunterregulierung der spezifischen Oberflächenantigene ihren Phänotyp, der dem intestinaler Makrophagen aus normaler, entzündungsfreier Mukosa ähnelt. Durch den gleichzeitigen Nachweis zweier Antigene auf einer Zelle in den durchgeführten immunhistochemischen Doppelfärbungen gelang die eindeutige Identifizierung der Makrophagen. Die durchflusszytometrischen Analysen zeigten, dass die untersuchten Antigene lediglich von den Monozyten/Makrophagen exprimiert wurden und nicht von den im Sphäroidmodell eingesetzten intestinalen Epithelzellen.

Pavli *et al* konnte bereits einen inaktiven Phänotyp intestinaler Makrophagen darstellen und zeigen, dass diese durch diesen Phänotyp immunsuppressiv wirken (81). In der vorliegenden Arbeit wurde im Besonderen die Anwesenheit von CD14-positiven Makrophagen mit monozytenähnlichem Phänotyp untersucht. Hier wird vermutet, dass diese CD14 positive Makrophagenpopulation eine gesteigerte Produktion von pro-entzündlichen Zytokinen wie z. B. IL-1 und TNF anregt und somit an der Aufrechterhaltung der Entzündung beteiligt ist (82).

Vor- und Nachteile des Sphäroidmodells zur *in vitro* Generierung intestinaler Makrophagen

Im Sphäroidmodell gelang die *in vitro* Generierung intestinaler Makrophagen auf einfache und zugleich anschauliche Weise. Trotzdem sind auch bei diesem Modell einige Einschränkungen kritisch zu diskutieren. Es muss beachtet werden, dass in den beschriebenen Versuchen zum Anzüchten der Sphäroide Tumorzelllinien verwendet wurden, da es nicht gelungen war, aus primären intestinalen Epithelzellen die Sphäroide zu generieren. Der Verlust aktivierungsassoziierter Oberflächenantigene auf den kokultivierten Monozyten/Makrophagen kann hier demnach auch auf einen Selbstschutzmechanismus der Tumorzellen zurückzuführen sein. Die beobachteten Effekte scheinen mit dem intestinalen Charakter der verwendeten Epithelzelllinie assoziiert zu sein, da in zahlreichen von Spoettl *et al* durchgeführten Vorversuchen für die Kontrollversuche eine Tumorzelllinie nicht intestinalen Ursprungs verwendet wurde.

Das Sphäroid als dreidimensionales Modell zeigt natürlich, im Gegensatz zu Monolayer- Zellkulturen, wenig Ähnlichkeiten mit den räumlichen Gegebenheiten, wie man sie im menschlichen Darm vorfindet. Hier sind Makrophagen und Epithelzellen von einer Basalmembran getrennt (42). Es konnte gezeigt werden, dass Basalmembran- Moleküle und Komponenten der extrazellulären Matrix über Zell-Interaktionen zur Differenzierung intestinaler Makrophagen führt. Des Weiteren ist ein enger Kontakt zwischen Epithelzellen und Fibroblasten für die Expression von Differenzierungsmarkern notwendig (48).

Bestimmte Bedingungen wie z. B. der pH- Wert, der O₂- Gradient oder die Produktion an extrazellulärer Matrix sind in multizellulären Sphäroiden der *in vivo* Situation dagegen ähnlicher als in Monolayer- Zellkulturen. In multizellulären Sphäroiden fand sich außerdem ein hoher Gehalt an extrazellulärer Matrix sowie Basalmembran Proteinen wie Kollagen I, Kollagen III und IV, Laminin und Fibronektin (83-85).

Allerdings treten in multizellulären Sphäroiden auch verschiedene Probleme, z. B. Nekrose der Zellen im Inneren der Aggregate auf. Ein weiterer kritischer Punkt ist die Auflösung von Sphäroiden in Zellsuspensionen durch Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA) für die durchflusszytometrische Analyse. Welchen Einfluss EDTA auf die

Expression der Oberflächenmerkmale auf Makrophagen und auf Epithelzellen hat ist noch unklar.

Trotz einiger Einschränkungen bietet das Sphäroidmodell die Möglichkeit zum Studium von Zellen, deren Phänotyp und Funktionalität Ähnlichkeiten zu dem von intestinalen Makrophagen sowohl in normaler, entzündungsfreier, als auch in entzündlich veränderter Mukosa aufweist.

5.2 Organotypische Zellkulturmodelle

Spoetl *et al* konnte bereits in Vorarbeiten das organotypische Kokulturmodell zur Generierung von Zellen mit intestinalem Makrophagentyp etablieren. Mit Hilfe des organotypischen Kollagenkulturmodells gelang es, bestimmte, im menschlichen Darm vorherrschende Bedingungen relativ genau darzustellen. Im Gegensatz zum multizellulären Sphäroid sind hier die Makrophagen und intestinalen Epithelzellen durch eine Basalmembran voneinander getrennt. Demnach scheint der Kontakt zwischen diesen beiden Zellpopulationen nicht so unmittelbar zu sein wie im Sphäroidmodell. Des Weiteren spielen andere Zellpopulationen, wie z. B. Fibroblasten, T- und B- Lymphozyten in der Lamina propria, die im multizellulären Sphäroid nicht eingesetzt werden, eine bedeutende Rolle bei der Differenzierung intestinaler Makrophagen(47).

Ein Nachteil im organotypischen Zellkulturmodell dagegen ist das fehlende Einwandern der Monozyten in die Aggregate, wie es physiologisch in der intestinalen Mukosa zu finden ist. Zudem ist eine Zellvereinzelung zur durchflusszytometrischen Analyse durch die starke Kontraktionsfähigkeit des verwendeten Kollagens und den durch eine aggressive Digestion des Kollagens verursachten Schaden nicht möglich (47).

In der vorliegenden Arbeit gelang eine Kokultur der drei Zellpopulationen, intestinale Fibroblastenzelllinie CCD-18 Co, Blutmonozyten und intestinale Epithelzelllinie HT-29 im organotypischen Kollagenkulturmodell. Die Transfektion der Fibroblastenzelllinie mit Ad5_ MCP-1 war jedoch aufgrund einer primären hohen MCP-1 Sekretion der Fibroblasten nicht möglich.

5.3 MCP-1 hemmt die Differenzierung intestinaler Makrophagen

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Chemokins MCP-1 auf die Differenzierung von Blutmonozyten zu intestinalen Makrophagen näher untersucht. Frisch elutrierte Monozyten wurden im dreidimensionalen Sphäroidmodell mit intestinalen Epithelzellen sieben Tage kokultiviert. In dieser Zeit zeigten die Blutmonozyten eine Differenzierung zu einem Phänotyp ähnlich dem der intestinalen Makrophagen. In den Versuchen konnte bestätigt werden, dass eine Transfektion der HT-29 Zellen mit dem Adenovirus Ad5_MCP-1 eine verstärkte Migration der Monozyten in das multizelluläre Sphäroid bewirkt, während dieser Effekt nach Transfektion mit einem leeren Virus (Ad5_Null) nicht zu beobachten war (4.3.1). Des Weiteren zeigte sich nach einer Transfektion mit Ad5_MCP-1 eine gestörte Differenzierung der Monozyten zu intestinalen Makrophagen. Hier fand sich in durchflusszytometrischen Analysen und immunhistochemischen Färbungen eine verstärkte Expression des Monozyten spezifischen Oberflächenantigens CD14, das während des Differenzierungsweges zu intestinalen Makrophagen normalerweise herunterreguliert wird. Die mit dem leeren Virus (Ad5_Null) transfizierten Sphäroide und die Kontrollaggregate zeigten den Phänotyp intestinaler Makrophagen mit einem Verlust des Markers CD14 (4.3.2).

Erhöhte MCP-1 Serumspiegel fanden sich bei atopischen Erkrankungen wie z.B. der allergischen Rhinitis oder Asthma, aber auch bei der Genese arteriosklerotischer Plaques, wo Makrophagen eine zentrale Rolle im Entzündungsgeschehen spielen (60). Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zeigen sich dagegen nicht immer erhöhte MCP-1 Serumspiegel, während jedoch in entzündeter Mukosa eine erhöhte Chemokin RNA-Expression vorliegt (67,86).

Die Schwere der Entzündung beim Morbus Crohn korreliert hier mit der Höhe der gemessenen MCP-1 Konzentration in entzündlich veränderter Mukosa. Des Weiteren gibt es Hinweise für einen Zusammenhang zwischen den Krankheitsverläufen und der verschiedenen MCP-1 Genotypen(87).

MCP-1 führt zu einer gesteigerten Migration von Monozyten in entzündete Darmschleimhaut und stört die Differenzierung zu intestinalen Makrophagen und spielt somit eine bedeutende Rolle bei der Aufrechterhaltung der chronischen Entzündung (88). Studien zeigten, dass MCP-1 eine verstärkte Migration von Monozyten in die entzündete Tunica Muscularis des Darmes bewirkt und dort zu

ortsständigen Makrophagen differenzieren und die Motilität des Darmes nachhaltig beeinflussen (89).

In nicht-transfizierten Sphäroiden zeigte sich bereits an Tag 1 eine geringe Sezernierung des proinflammatorischen Chemokins MCP-1, die nach sieben Tagen deutlich ansteigt (4.1). Diese niedrige Konzentration scheint den Differenzierungsweg der intestinalen Makrophagen nicht zu beeinflussen. Es wird angenommen, dass in der intestinalen Mukosa physiologisch eine kontinuierliche, niedrige Produktion an proinflammatorischen Chemokinen wie MCP-1 stattfindet, die für die Einwanderung von Monozyten in die Darmschleimhaut verantwortlich ist. Diese Konzentration könnte ausreichend sein, um die zur Differenzierung fähige Subpopulation der Blutmonozyten anzulocken (5.4). Entscheidend scheint hier die Konzentration von MCP-1 während der frühen Phase der Differenzierung und während der Migration der Monozyten in das multizelluläre Sphäroid zu sein (68).

In der vorliegenden Arbeit liegt die optimale „multiplicity of infection“ (MOI) mit $\frac{1}{4}$ deutlich niedriger als in Vorarbeiten, in denen mit einer MOI von 1 gearbeitet wurde. Eine Transfektion mit einer MOI von 1 resultierte hier in einer erhöhten Zelllyse und einem Zerfall der Sphäroide nach 7 Tagen. Während die Konzentration 48 h nach Transfektion der HT-29 Zellen mit Ad5_MCP-1 mit einer MOI von 1 bei 989 pg/ml lag, wurde die MCP-1 Konzentration nach Transfektion mit einer MOI von $\frac{1}{4}$ bei nur 28 pg/ml gemessen. An Tag 1 nach Zugabe der Blutmonozyten lag die Konzentration bei 253 pg/ml (4.1). Diese niedrigen Konzentrationen des proinflammatorischen Chemokins scheinen auszureichen, um die Differenzierung der Monozyten zu intestinalen Makrophagen zu unterdrücken.

5.4 Einfluss der Monozytenanzahl auf die Differenzierung intestinaler Makrophagen

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, führt die Anwesenheit des Chemokins MCP-1 zu einer deutlich erhöhten Anzahl an Monozyten im multizellulären Sphäroid (4.3.1). Spoettl *et al* diskutierte bereits in Vorarbeiten die Möglichkeit, dass die hohe Monozytenzahl als indirekter Effekt von MCP-1 den Differenzierungsprozess intestinaler Makrophagen beeinflusst.

Eine Erklärung für die beobachtete Störung der Differenzierung wäre, dass im gesunden Darm nur eine Subpopulation an Blutmonozyten fähig ist den Differenzierungsprozess zu intestinalen Makrophagen zu durchlaufen. Nur diese Subpopulation wandert in die Darmschleimhaut ein und differenziert zu intestinalen Makrophagen. Bei Entzündung des Gewebes kommt es zu einer verstärkten Sezernierung proinflammatorischer Chemokine wie MCP-1 und somit zu einer übermäßigen Rekrutierung unspezifischer Blutmonozyten in die entzündlich veränderte Darmmukosa, sodass die zur Differenzierung fähige Subpopulation an Monozyten zu klein ist, um sie zu detektieren (68).

In der vorliegenden Arbeit wurde auf einen möglichen Einfluss der Monozytenzahl auf die Differenzierung zu intestinalen Makrophagen näher eingegangen. Dazu wurde eine Titrierung der zugegebenen Monozyten in das Multizelluläre Sphäroid Modell mit Reduktion der Monozytenzahl vorgenommen. Die aus 4.000 HT-29 Zellen angezüchteten Sphäroide wurden mit je 40.000, 4.000, 400 und 40 frisch elutrierten Blutmonozyten kokultiviert. Die mit Ad5_MCP-1 transfizierten Sphäroide wurden den nicht- transfizierten Kontrollaggregaten und den Ad5_Null transfizierten Sphäroiden gegenübergestellt. Hier zeigte sich bei Zugabe hoher Monozytenzahlen (40.000 und 4.000) bereits an Tag 3 eine signifikanter Verlust des monozytenspezifischen Oberflächenmarkers CD14 in den nicht- transfizierten Kontrollaggregaten im Vergleich zu den Ad5_MCP-1 transfizierten Sphäroiden. Bereits bei Kokultur der Ad5_MCP-1 transfizierten Sphäroiden mit nur 4.000 Monozyten zeigte sich nach 7 Tagen ein deutlich niedrigerer prozentualer Anteil an CD14 positiven Zellen im Vergleich zur Kokultur mit 40.000 Monozyten. Bei Zugabe geringer Monozytenzahlen (400) zeigten sowohl die nicht- transfizierten Kontrollaggregate und die Ad5_Null transfizierten Sphäroide als auch die Ad5_MCP-1 transfizierten Sphäroide eine

Differenzierung zu intestinalen Makrophagen mit Downregulierung des Oberflächenmarkers CD14. Somit scheint die Anzahl an Monozyten in der Mukosa eine entscheidende Auswirkung auf die Differenzierung zu intestinalen Makrophagen zu haben. Somit würde das proinflammatorische Chemokin MCP-1 eine indirekte Wirkung auf den Differenzierungsprozess haben und die Differenzierung der Blutmonozyten zu intestinalen Makrophagen durch eine verstärkte Rekrutierung der Monozyten in die Mukosa hemmen.

5.5 Zusammenfassung

Intestinale Makrophagen stellen eine der bedeutsamsten Komponenten des intestinalen Immunsystems dar und spielen eine besondere Rolle innerhalb der Immunpathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Sie durchlaufen während ihrer Entwicklung einen komplexen Differenzierungsprozess. In Vorarbeiten konnte ein dreidimensionales Zellkulturmodell (Sphäroidmodell) zur *in vitro* Differenzierung von intestinalen Makrophagen etabliert werden.

Des Weiteren zeigte sich in der Mukosa von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine erhöhte Sekretion von MCP-1 durch Epithelzellen. Spoettl *et al* konnte bereits eine durch Anwesenheit des Chemokins MCP-1 verstärkte Migration der Monozyten in das dreidimensionale Sphäroidmodell nachweisen. Darüber hinaus gelang es, die Differenzierung der Blutmonozyten zu intestinalen Makrophagen durch MCP-1 zu hemmen (68). Beide Wirkungen von MCP-1 konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (5.5.1). Es wurde unter anderem näher auf die Wirkungsweise des Chemokins eingegangen. Ein möglicher Einfluss der Monozytenzahl auf die Differenzierung zu intestinalen Makrophagen im Sphäroidmodell wurde überprüft (5.5.2).

5.5.1 Untersuchung der *in vitro* Differenzierung intestinaler Makrophagen unter Einfluss von MCP-1

Wie in Vorarbeiten gelang die Untersuchung der *in vitro* Differenzierung intestinaler Makrophagen im Sphäroidmodell. Sphäroide, die mit dem adenoviralen Vektor Ad5_MCP-1 transfiziert wurden zeigten nach sieben-tägiger Kokultivierung mit Monozyten eine erhöhte Expression des monozytenspezifischen Oberflächenmarkers CD14. Im Vergleich fand sich in nicht-transfizierten Kontrollaggregaten und in Ad5_Null transfizierten Sphäroiden eine Differenzierung der eingewanderten Monozyten zu intestinalen Makrophagen mit Verlust von CD14. Ebenso bestätigt werden konnte die Wirkung des Chemokins MCP-1 mit einer verstärkten Rekrutierung der Monozyten in das Sphäroid.

Des Weiteren wurde die Konzentration von MCP-1 an Tag 1 und Tag 7 bestimmt. Hier zeigte sich, dass bereits eine niedrige Konzentration des Chemokins ausreicht, um den Differenzierungsprozess der Monozyten zu stören.

5.5.2 Untersuchung der Wirkungsmechanismen von MCP-1

In der vorliegenden Arbeit wurde ein möglicher indirekter Effekt von MCP-1 auf die Differenzierung zu intestinalen Makrophagen überprüft. Es wurde eine Titrierung der zugegebenen Monozyten in das Multizelluläre Sphäroid Modell mit Reduktion der Monozytenzahl durchgeführt. Die Experimente ergaben, dass bei Zugabe hoher Monozytenzahlen unter Anwesenheit von MCP-1 der Differenzierungsprozess zu intestinalen Makrophagen gestört wird, während bei geringer Monozytenzahl im Sphäroid ein Phänotyp ähnlich dem intestinaler Makrophagen erzeugt wird.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Chemokin MCP-1 durch die verstärkte Rekrutierung von Monozyten in die entzündete Darmmukosa einen indirekten Effekt auf die Differenzierung der intestinalen Makrophagen hat.

Literaturverzeichnis

1. Schmidt R, Thews G, Lang F. *Physiologie des Menschen*. Springer- Verlag, 2000.
2. Welsch U. *Lehrbuch Histologie*. Urban & Fischer Verlag, 2003.
3. Alexander K, Daniel WG, Diener HC, Freund M, Köhler H, Matern S, Maurer HH, Michel BA, Nowak D, Risler T, Schaffner A, Scherbaum WA, Sybrecht GW, Wolfram G, Zeitz M. *Thieme`s Innere Medizin* TIM. Georg Thieme Verlag, 1999.
4. Berdel WE, Böhm M, Claasen M, Diehl V, Kochsiek K und Schmiegel W. *Innere Medizin*. Urban & Fischer Verlag, 2004.
5. Böcker W, Denk H, Heitz PU. *Pathologie*. Urban & Fischer Verlag, 2004
6. Ohmen, J. D. *et al.* Susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16 has a role in Crohn's disease, but not in ulcerative colitis. *Hum. Mol. Genet.* 5, 1679-1683 (1996)
7. Van der Linde K, Kuiper EJ, de Rooij FW, Wilson JH. From gene to disease; 'frame shift'-mutation in the CARD15-gene and Crohn's disease. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde* 2002 Dec 28; 146(52):2539-42.
8. Seiderer J, Schnitzler F, Brand S, Staudinger T, Pfennig S, Herrmann K, Hofbauer K, Dambacher J, Tillack C, Sackmann M, Göke B, Lohse P, Ochsenkühn T. Homozygosity for the CARD15 frameshift mutation 1007fs is predictive of early onset of Crohn's disease with ileal stenosis, entero-enteral fistulas, and frequent need for surgical intervention with high risk of re-stenosis. *Scand J Gastroenterol.* 2006 Dec;41(12):1421-32.
9. Koloski NA, Bret L, Radford-Smith G. Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease: A critical review of the literature. *World J Gastroenterol.* 2008 Jan 14; 14(2):165-73.
10. Jantchou P, Monnet E, Carbonnel F. Environmental risk factors in Crohn's disease and ulcerative colitis (excluding tobacco and appendectomy). *Gastroenterol Clin Biol.* 2006 Jun-Jul; 30(6-7):859-67.
11. Lakatos PL, Szamosi T, Lakatos L. Smoking in inflammatory bowel diseases: good, bad or ugly? *World J Gastroenterol.* 2007 Dec 14; 13(46):6134-9.

- 12.Chandran P, Satthaporn S, Robins A, Eremin O. Inflammatory bowel disease: dysfunction of GALT and gut bacterial flora (II). *Surgeon*. 2003 Jun; 1(3):125-36.
- 13.Linskens RK, Huijsdens XW, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM, Meuwissen SG. The bacterial flora in inflammatory bowel disease: current insights in pathogenesis and the influence of antibiotics and probiotics. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 2001; (234):29-40.
- 14.Andus T, Daig R, Vogl D, Aschenbrenner E, Lock G, Hollerbach S, Köllinger M, Schölmerich J, Gross V. Imbalance of the interleukin 1 system in colonic mucosa--association with intestinal inflammation and interleukin 1 receptor antagonist [corrected] genotype 2. *Gut*. 1997 Nov; 41(5):651-7.
- 15.Boirivant M, Marini M, Di Felice G, Pronio AM, Montesani C, Tersigni R, Strober W. Lamina propria T cells in Crohn's disease and other gastrointestinal inflammation show defective CD2 pathway-induced apoptosis. *Gastroenterology*. 1999 Mar; 116(3):557-65.
- 16.Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol*. 1996 Aug 1; 157(3):1261-70.
- 17.Yao K, Iwashita A, Yao T, Takemura S, Furukawa K, Matsui T, Aoyagi K, Increased numbers of macrophages in noninflamed gastroduodenal mucosa of patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci*. 1996 Nov; 41(11):2260-7.
- 18.Schölmerich J. Inflammatory bowel disease: Pandora's box, present and future. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Aug; 1072:365-78.
- 19.Beagley, K W, Elson, C O, 1992. Cells and Cytokines in mucosal immunity and inflammation. *Gastroenterol. Clin. North Am*. 21: 347-366
- 20.Daig R, Andus T, Aschenbrenner E, Falk W, Schölmerich J, Gross V. Increased interleukin 8 expression in the colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. 1996 Feb; 38(2):216-22.
- 21.Neurath MF, Meyer zum Büschenfelde KH. Protective and pathogenic roles of cytokines in inflammatory bowel diseases. *J Investig Med*. 1996 Dec; 44(9):516-21.
- 22.Plevy SE, Landers CJ, Prehn J, Carramanzana NM, Deem RL, Shealy D, Targan SR. A role for TNF-alpha and mucosal T helper-1 cytokines in the pathogenesis of Crohn's Disease. *J. Immunol*. 1997. 159: 6276-6282.
- 23.Isaacs KL, Sartor RB, Haskill S. Cytokine messenger RNA profiles in inflammatory bowel disease mucosa detected by polymerase chain reaction amplification. *Gastroenterology*. 1992 Nov;103(5):1587-95.

24. Schreiber S, Heinig T, Thiele HG, Raedler A. Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1995 May;108(5):1434-44.
25. Ludwiczek O, Vannier E, Borggraefe I, Kaser A, Siegmund B, Dinarello CA, Tilg H. Imbalance between interleukin-1 agonists and antagonists: relationship to severity of inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol*. 2004 Nov; 138(2):323-9.
26. Sartor RB. Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. *Gastroenterology*. 1994 Feb; 106(2):533-9.
27. Mahida YR. The key role of macrophages in the immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2000 Feb; 6(1):21-33.
28. Rugtveit J, Nilsen EM, Bakka A, Carlsen H, Brandtzaeg P, Scott H. Cytokine profiles differ in newly recruited and resident subsets of mucosal macrophages from inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1997 May; 112(5):1493-505.
29. Smith PD, Janoff EN, Mosteller-Barnum M, Merger M, Orenstein JM, Kearney JF, Graham MF. Isolation and purification of CD14- negative mucosal macrophages from normal human small intestine. *J Immunol Methods* 1997; 202:1-11.
30. Rugveit J, Haraldsen G, Hogasen AK, Bakka A, Brandtzaeg P, Scott H. Respiratory burst of intestinal macrophages in inflammatory bowel disease is mainly caused by CD 14+L1+ monocyte derived cells. *Gut* 1995; 37:367-373.
31. Rogler G, Hausmann M, Vogl D, Aschenbrenner E, Andus T, Falk W, Andreesen R, Schölmerich J, Gross V. Isolation and phenotypic characterization of colonic macrophages. *Clin Exp Immunol*. 1998 May; 112(2):205-15.
32. Rugveit J, Bakka A, Brandtzaeg P. Differential distribution of B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86) costimulatory molecules on mucosal macrophage subsets in human inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immuno* 1997; 110:104-113.
33. Rogler G, Hausmann M, Spöttl T, Vogl D, Aschenbrenner E, Andus T, Falk W, Schölmerich J, Gross V. T-cell co-stimulatory molecules are upregulated on intestinal macrophages from inflammatory bowel disease mucosa. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1999 Oct; 11(10):1105-11.
34. Rogler G, Andus T, Aschenbrenner E, Vogl D, Falk W, Schölmerich J, Gross V. Alterations of the phenotype of colonic macrophages in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1997 Sep; 9(9):893-9.

35. Rogler G, Brand K, Vogl D, Page S, Hofmeister R, Andus T, Knuechel R, Baeuerle PA, Schölmerich J, Gross V. Nuclear factor kappa B is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology*. 1998 Aug; 115(2):357-69.
36. Kunz-Schugart L, Kreutz M, Knüchel R. 1998 Multicellular spheroids: a three dimensional in vitro culture system to study tumor biology. *Int.J.Exp.Path.* 79:1-23
37. Ganten D, Ruckpaul K. (Hrsg.) 1997. Molekular- und Zellbiologische Grundlagen. Handbuch der molekularen Medizin. Springer Verlag Berlin, Heidelberg.
38. Sutherland R M, Mc Credie J A, Inch W R. 1971. Growth of multicellular spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 46:113-120
39. Inch W R, Mc Credie J A, Sutherland R M. 1970. Growth of nodular carcinomas in rodents compared with multi-cell spheroids in tissue culture. *Growth* 34:271-282.
40. Olive P L, Durand R E. 1994. Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics. *Cancer Metastasis Rev.* 13:121-138.
41. Konur A, Kreutz M, Knüchel R, Krause SW, Andreesen R. Three-dimensional co-culture of human monocytes and macrophages with tumor cells: analysis of macrophage differentiation and activation. *Int J Cancer*. 1996 May 29; 66(5):645-52.
42. Spöttl T, Hausmann M, Kreutz M, Peuker A, Vogl D, Schölmerich J, Falk W, Andreesen R, Andus T, Herfarth H, Rogler G. Monocyte differentiation in intestine-like macrophage phenotype induced by epithelial cells. *J Leukoc Biol*. 2001 Aug; 70(2):241-51.
43. Chevallay B, Herbage D. Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy. *Med Biol Eng Comput*. 2000 Mar; 38(2):211-8.
44. Cleator G M, Beswick T S. 1972. The probable role of collagen when used as a growth surface for cell cultures. *Cytobios*. 20:231-239.
45. Stephenson E M, 1975. A cell culture substrate obtained from heat-fused collagen. *Experimentia* 31: 1473-1474.
46. Bell E, Ivarsson B, Merrill C. 1979. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc. Natl. ACAD. Sci.* 76: 1274-1278.

-
47. Spoetl T, Hausmann M, Gunckel M, Herfarth H, Herlyn M, Schoelmerich J, Rogler G. A new organotypic model to study cell interactions in the intestinal mucosa. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2006 Aug; 18(8):901-9.
 48. Simon-Assmann P, Kedinger M, De Arcangelis A, Rousseau V, Simo P. Extracellular matrix components in intestinal development. *Experientia*. 1995 Sep 29; 51(9-10):883-900.
 49. Hohn HP, Grümmer R, Bosserhoff S, Graf-Lingnau S, Reuss B, Bäcker C, Denker HW. The role of matrix contact and of cell-cell interactions in choriocarcinoma cell differentiation. *Eur J Cell Biol*. 1996 Jan; 69(1):76-85.
 50. Spoetl T, Hausmann M, Menzel K, Piberger H, Herfarth H, Schoelmerich J, Bataille F, Rogler G. Role of soluble factors and three-dimensional culture in in vitro differentiation of intestinal macrophages. *World J Gastroenterol*. 2007 Feb 21; 13(7):1032-41.
 51. Ono SJ, Nakamura T, Miyazaki D, Ohbayashi M, Dawson M, Toda M. Chemokines: roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Jun; 111(6):1185-99; quiz 1200.
 52. Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*. 1998 Apr 9; 392(6676):565-8.
 53. Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol*. 2007; 25:787-820.
 54. Rollins BJ. Chemokines. *Blood*. 1997 Aug 1; 90(3):909-28.
 55. Zlotnik A, Morales J, Hedrick JA. Recent advances in chemokines and chemokine receptors. *Crit Rev Immunol*. 1999; 19(1):1-47.
 56. Gillitzer R, Goebeler M. Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol*. 2001 Apr; 69(4):513-21.
 57. Papadakis KA. Chemokines in inflammatory bowel disease. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2004 Jan; 4(1):83-9.
 58. Zhong W, Kolls JK, Chen H, McAllister F, Oliver PD, Zhang Z. Chemokines orchestrate leukocyte trafficking in inflammatory bowel disease. *Front Biosci*. 2008 Jan 1; 13:1654-64.
 59. Badolato R, Ponzi AN, Millesimo M, Notarangelo LD, Musso T. Interleukin-15 (IL-15) induces IL-8 and monocyte chemoattractant protein 1 production in human monocytes. *Blood*. 1997 Oct 1; 90(7):2804-9.
 60. Banks C, Bateman A, Payne R, Johnson P, Sheron N. Chemokine expression in IBD. Mucosal chemokine expression is unselectively increased in both ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Pathol*. 2003 Jan; 199(1):28-35.

-
61. Hoogeveen RC, Morrison A, Boerwinkle E, Miles JS, Rhodes CE, Sharrett AR, Ballantyne CM. Plasma MCP-1 level and risk for peripheral arterial disease and incident coronary heart disease: Atherosclerosis Risk in Communities study. *Atherosclerosis*. 2005 Dec; 183(2):301-7. Epub 2005 Apr 14.
 62. Hohensinner PJ, Kaun C, Rychli K, Ben-Tal Cohen E, Kastl SP, Demyanets S, Pfaffenberger S, Speidl WS, Rega G, Ullrich R, Maurer G, Huber K, Wojta J. Monocyte chemoattractant protein (MCP-1) is expressed in human cardiac cells and is differentially regulated by inflammatory mediators and hypoxia. *FEBS Lett*. 2006 Jun 12; 580(14):3532-8. Epub 2006 May 24.
 63. Morimoto H, Takahashi M, Izawa A, Ise H, Hongo M, Kolattukudy PE, Ikeda U. Cardiac overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in transgenic mice prevents cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Circ Res*. 2006 Oct 13; 99(8):891-9. Epub 2006 Sep 21.
 64. Xia Y, Frangogiannis NG. MCP-1/CCL2 as a therapeutic target in myocardial infarction and ischemic cardiomyopathy. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2007 Jun; 6(2):101-7.
 65. Grimm MC, Elsbury SK, Pavli P, Doe WF. Enhanced expression and production of monocyte chemoattractant protein-1 in inflammatory bowel disease mucosa. *J Leukoc Biol*. 1996 Jun; 59(6):804-12.
 66. MacDermott RP. Alterations of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*. 1996 Dec; 31(6):907-16.
 67. Reinecker HC, Loh EY, Ringler DJ, Mehta A, Rombeau JL, MacDermott RP. Monocyte-chemoattractant protein 1 gene expression in intestinal epithelial cells and inflammatory bowel disease mucosa. *Gastroenterology*. 1995 Jan; 108(1):40-50.
 68. Spoetl T, Hausmann M, Herlyn M, Gunckel M, Dirmeier A, Falk W, Herfarth H, Schoelmerich J, Rogler G. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) inhibits the intestinal-like differentiation of monocytes. *Clin Exp Immunol*. 2006 Jul; 145(1):190-9.
 69. Marshall C J, Franks L M, Carbonell A W. Markers of neoplastic transformation in epithelial cell lines derived from human carcinomas. *J. Natl. Cancer Ins.* 1977; 58:1743-1751.
 70. Takenaga K, Nakanishi H, Wada K, Suzuki M, Matsuzaki O, Matsuura A, Endo H. (Increased expression of S100A4, a metastasis-associated gene, in human colorectal adenocarcinomas. *Clin Cancer Res*. 1997 Dec; 3(12 Pt 1):2309-16. PMID: 9815629 [PubMed - indexed for MEDLINE]
 71. Graham FL, Smiley J, Russell WC and Nairn R (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." *J Gen Virol* 36(1): 59-74.

72. Shaw G, Morse S, Ararat M and Graham FL (2002). "Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells." *Faseb J* 16(8): 869-71.
73. Vile RG, Russell SJ, Lemoine NR. (2000). Cancer gene therapy: hard lessons and new courses. *Gene Ther.* 1:2 – 8
74. Bett A J, Prevec L, Graham F L (1993). Packaging capacity and stability of human Adenovirus type 5 vectors. *J. Virol.* 67: 5911 - 5921.
75. He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW and Vogelstein B (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(5): 2509-14. Hehir
76. Doyle A, Griffith J B, Newell D G (eds.) 1994. Cells & tissue culture: laboratory procedures. Wiley, New York
77. Carlsson J, Yuhas J M, 1984. Liquid- overlay culture of cellular spheroids. In: *Spheroids in cancer research*. (Acker H, Carlsson J, Durand R, Sutherland R M eds.) Springer, Heidelberg, Berlin, New York, 95:1-24
78. Aigner A, Neumann S, 1997. Immunchemie. Grundlagen, Anwendungen, Perspektiven. G. Fischer, Stuttgart, Jena
79. Smith PD, Smythies LE, Mosteller-Barnum M, Sibley DA, Russell MW, Merger M, Sellers MT, Orenstein JM, Shimada T, Graham MF, Kubagawa H. Intestinal macrophages lack CD14 and CD89 and consequently are down-regulated for LPS- and IgA-mediated activities. *J Immunol.* 2001 Sep 1;167(5):2651-6.
80. Hausmann M, Spöttl T, Andus T, Rothe G, Falk W, Schölmerich J, Herfarth H, Rogler G. Subtractive screening reveals up-regulation of NADPH oxidase expression in Crohn's disease intestinal macrophages. *Clin Exp Immunol.* 2001 Jul;125(1):48-55.
81. Pavli P, Hume DA, Van De Pol E, Doe WF. Dendritic cells, the major antigen-presenting cells of the human colonic lamina propria. *Immunology.* 1993 Jan; 78(1):132-41.
82. Grimm MC, Pavli P, Van de Pol E, Doe WF. Evidence for a CD14+ population of monocytes in inflammatory bowel disease mucosa--implications for pathogenesis. *Clin Exp Immunol.* 1995 May;100(2):291-7.
83. Enam SA, Rosenblum ML, Edvardsen K. Role of extracellular matrix in tumor invasion: migration of glioma cells along fibronectin-positive mesenchymal cell processes. *Neurosurgery.* 1998 Mar;42(3):599-607; discussion 607-8.
84. Davies CD, Müller H, Hagen I, Gårseth M, Hjelstuen MH. Comparison of extracellular matrix in human osteosarcomas and melanomas growing as xenografts, multicellular spheroids, and monolayer cultures. *Anticancer Res.* 1997 Nov-Dec;17(6D):4317-26.

-
- 85.Santini MT, Rainaldi G, Indovina PL. Apoptosis, cell adhesion and the extracellular matrix in the three-dimensional growth of multicellular tumor spheroids. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2000 Nov-Dec; 36(2-3):75-87.
- 86.Autschbach F, Giese T, Gassler N, Sido B, Heuschen G, Heuschen U, Zuna I, Schulz P, Weckauf H, Berger I, Otto HF, Meuer SC. Cytokine/chemokine messenger-RNA expression profiles in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Virchows Arch*. 2002 Nov;441(5):500-13. Epub 2002 Jul 23.
- 87.Herfarth H, Göke M, Hellerbrand C, Mühlbauer M, Vogl D, Schölmerich J, Rogler G. Polymorphism of monocyte chemoattractant protein 1 in Crohn's disease. *Int J Colorectal Dis*. 2003 Sep;18(5):401-5. Epub 2003 Feb 1.
- 88.Uguccioni M, Gionchetti P, Robbiani DF, Rizzello F, Peruzzo S, Campieri M, Baggiolini M. Increased expression of IP-10, IL-8, MCP-1, and MCP-3 in ulcerative colitis. *Am J Pathol*. 1999 Aug;155(2):331-6.
- 89.Hori M, Nobe H, Horiguchi K, Ozaki H. MCP-1 targeting inhibits muscularis macrophage recruitment and intestinal smooth muscle dysfunction in colonic inflammation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008 Feb;294(2):C391-401. Epub 2007 Oct 31.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Katharina Zeitler

Weißenburgstraße 39

93055 Regensburg

E-mail: katharina.zeitler@klinik.uni-regensburg.de

Geboren am 26.5.1983 in München

Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung

1989-1993	Besuch der Grundschule Nord in Kelheim
1993-1999	Besuch des Donau-Gymnasiums in Kelheim
1999-2002	Besuch des Johannes-Nepomuk-Gymnasiums in Rohr i.N., Abschluss mit Abitur

Berufliche Ausbildung

Oktober 2002-September 2004	Medizinstudium, vorklinischer Abschnitt an der Universität Regensburg Abschluss mit <i>Physikum</i>
März 2006-August 2007	Experimenteller Teil der Doktorarbeit im Bereich der Inneren Medizin mit dem Thema:

„Untersuchung der Mechanismen, über die MCP-1 die Differenzierung von intestinalen Makrophagen verhindert“

bei Prof. Dr. Dr. Gerhard Rogler

Februar 2005- April 2007

Famulaturen

Chirurgie und Unfallchirurgie,
Kreiskrankenhauses in Kelheim
Innere Medizin II,
Kreiskrankenhaus in Kelheim
Gynäkologie und Geburtshilfe,
Kreiskrankenhaus in Kelheim
chirurgische Gemeinschaftspraxis,
Regensburg
Institut für Rechtsmedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität,
München

August 2007-Juli 2008

Praktischen Jahr

Institut für Pathologie ,
Universität Regensburg
Innere Medizin/ Bereich Gastroenterologie,
Universitätsklinikum Regensburg
Innere Medizin/Bereich Kardiologie und
Nephrologie,
Universitätsklinikum Regensburg
Chirurgie/Bereich Viszeralchirurgie,
Universitätsklinikum Regensburg

November 2008

Abschluss Medizinstudium/*Staatsexamen*

Seit Januar 2009

Assistenzärztin am Institut für Pathologie
der Universität Regensburg bei
Prof. Dr. Ferdinand Hofstädter

Danksagung

Mein Dank gilt vor allem Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Schölmerich für die Möglichkeit zur Erstellung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Prof. Dr.med. Dr. phil. Gerhard Rogler für die intensive Betreuung auch nach seinem Verlassen des Universitätsklinikums Regensburg und sein großes persönliches Interesse an dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Bernd Salzberger danke ich für seine Bereitschaft Herrn Prof. Rogler in seiner gutachterlichen Tätigkeit zu vertreten.

Bei der ganzen Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Gerhard Rogler möchte ich mich für die freundliche Aufnahme und für die Bereitschaft bedanken, mir bei Fragen zu helfen und mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

Ein herzliches Dankeschön geht dabei an Daniela Vogl, Manuela Gunckel und Dr. Heidi Piberger für ihre große Hilfsbereitschaft und für ihre stets freundliche Art, mich bei Problemen zu beraten und zu unterstützen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen aus der Inneren Medizin I und der Hämatologie/Onkologie für die stete Hilfsbereitschaft, besonders bei der Überlassung der Monozyten.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, 12. September 2011

(Katharina Zeitler)

